

**Effekte von Silica-Nanopartikeln
auf den Modellorganismus
*Caenorhabditis elegans***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Adam Thomas Pluskota
aus Posen

Düsseldorf, Oktober 2011

aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Anna von Mikecz
Koreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2011

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	III
Abstract.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Silica-Nanopartikel.....	1
1.1.1 Zusammensetzung, Verbreitung, Herstellung.....	1
1.1.2 Interaktionen von Silica-Nanopartikeln <i>in vitro</i>	4
1.1.3 Biologische Effekte von Silica-Nanopartikeln.....	7
1.2 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	10
1.2.1 Einführung.....	10
1.2.2 Nachkommenproduktion in <i>Caenorhabditis elegans</i> Hermaphroditen.....	18
1.2.3 Das Eiablageverhalten von <i>Caenorhabditis elegans</i> Hermaphroditen.....	20
2 Wissenschaftliche Fragestellung.....	24
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Reagenzien.....	25
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	27
3.1.3 Antikörper.....	32
3.1.4 Silica-Partikel.....	33
3.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	33
3.1.6 Geräte.....	34
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Kultivierung von Nematoden.....	36
3.2.2 Untersuchungen zur Lebensspanne.....	38
3.2.3 Untersuchungen zur Nachkommenproduktion und zum Eiablageverhalten.....	38
3.2.4 Herstellung von mikroskopischen Präparaten.....	39
3.2.5 Mikroskopie, Bildverarbeitung und Auswertung.....	40
3.2.6 Zellkultur.....	41
3.2.7 Partikelfällungsexperimente.....	42
3.2.8 SDS-PAGE und Western Blot.....	43
3.2.9 Immundetektion.....	44
3.2.10 Statistik.....	44
4 Ergebnisse.....	46
4.1 Interaktionen von Silica-Partikeln <i>in vitro</i>	46
4.2 Aufnahme von Silica-Nanopartikeln durch <i>Caenorhabditis elegans</i>	51
4.3 Die Lebensspanne nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln.....	53
4.4 Akkumulation von Lipofuscin nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln.....	54

4.5	Effekt auf Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit	56
4.5.1	Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit bei Behandlung ab L4	56
4.5.2	Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit bei Behandlung ab Adult.....	58
4.5.3	Silica-Nanopartikel induzierter Effekt auf Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit bei gleichzeitiger Behandlung mit Ethosuximid	60
4.5.4	Zeitverlauf des Auftretens von BOW-Phänotypen.....	62
4.6	Morphologie der HSN Motoneuronen	64
4.7	Morphologie der Vulvamuskeln	67
4.8	Untersuchungen zur Eiablage	69
5	Diskussion	71
5.1	Silica-Partikel bilden in Zelllysat eine Proteincorona	71
5.2	Silica-Nanopartikel werden von <i>C. elegans</i> aufgenommen.....	76
5.3	Silica-Nanopartikel zeigen keinen Effekt auf die Lebensspanne und die Lipofuscin- Akkumulation in <i>C. elegans</i>	77
5.4	Silica-Nanopartikel induzieren reproduktive Seneszenz in <i>C. elegans</i>	78
5.5	Silica-Nanopartikel stören die Funktion des Eiablage-Apparats	80
5.6	Nano-Bio-Interaktionen von Silica-Nanopartikeln	84
6	Literaturverzeichnis	85
7	Anhang	94
7.1	Abkürzungsverzeichnis	94
7.2	Abbildungsverzeichnis	98
7.3	Lebenslauf	99
Danksagung		100
Erklärung		101

Zusammenfassung

Silica-Nanopartikel werden bereits seit Jahrzehnten in industriellem Maßstab hergestellt. Sie finden in vielfältigen technischen Prozessen und in einer breiten Produktpalette Anwendung. Ihre potenziellen Interaktionen mit biologischen Systemen sind bislang jedoch unzureichend verstanden. Einige Studien berichten von nachteiligen biologischen Auswirkungen. In der vorliegenden Arbeit sollen Interaktionen von Silica-Nanopartikeln mit zellulären Proteinen und deren mögliche Auswirkungen auf den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* untersucht werden.

Die Silica-Partikel Interaktionen *in vitro* wurden in Fällungsexperimenten untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl Silica-Nanopartikel als auch feine Silica-Partikel ausgewählte zelluläre Proteine adsorbieren. Die Protein-Partikel-Komplexe bilden sich in weniger als 5 Minuten und sind über einen Zeitraum von mindestens 16 Stunden stabil. Aufgrund der Proteinadsorption bildet sich an den Silica-Partikeln in Zellysat eine Proteincorona, deren Zusammensetzung von der Größe der Silica-Partikel abhängt.

Fluoreszenzmarkierte Silica-Nanopartikel konnten im Darm von behandelten *Caenorhabditis elegans* Hermaphroditen nachgewiesen werden. Eine durch Silica-Nanopartikel induzierte Veränderung der Lebenspanne der Hermaphroditen konnte nicht festgestellt werden. Nematoden, die mit Silica-Nanopartikeln behandelt wurden, zeigten jedoch eine Abnahme der Nachkommenproduktion bei gleichzeitiger Zunahme des Eiablage-Phänotyps „bag of worms“ (BOW), bei dem sich die nicht abgelegten Eier innerhalb der Hermaphroditen zu Larven entwickeln und schlüpfen. Beide Effekte traten unabhängig davon auf, ob die Nematoden ab dem letzten Larvalstadium (L4) oder als Adulte mit den Silica-Nanopartikeln behandelt wurden. Die Silica-Nanopartikel interferieren also hierbei nicht mit der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans*. Der altersassoziierte BOW-Phänotyp tauchte bei Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen zum Teil zwei Tage früher auf als bei unbehandelten Nematoden. In morphologischen Untersuchungen, die sich auf die für die Eiablage relevanten Muskeln und Motorneurone bezogen, konnten keine

spezifischen Silica-Nanopartikel induzierten Gewebeveränderungen festgestellt werden. Die Hermaphroditen die mit Silica-Nanopartikeln behandelt wurden, wiesen ein verändertes Eiablage-Verhalten auf, das durch eine eingeschränkte neuromuskuläre Funktion des Eiablage-Apparats erklärt werden kann.

Diese Arbeit zeigt, dass feine und nanoskalige Silica-Partikel in Zelllysate eine Proteincorona bilden, deren Zusammensetzung sich, durch die Partikelgröße bedingt, unterscheidet. Die Behandlung von *Caenorhabditis elegans* Hermaphroditen mit Silica-Nanopartikeln führt zu reproduktiver Seneszenz. Außerdem wird durch die Silica-Nanopartikelbehandlung das Eiablage-Verhalten inhibiert, was sich in der verfrühten Zunahme des altersassoziierten BOW-Phänotyps äußert.

Abstract

Silica-nanoparticles are produced on industrial scale since decades. They are implemented in manifold technical processes and a wide range of products. Their potential interactions with biological systems are inadequately understood until now. Some studies report adverse biological impact. The present work studies the interactions of silica-nanoparticles with cellular proteins and their potential influence on the modelorganism *Caenorhabditis elegans*.

The silica-particle interactions *in vitro* were analysed in precipitation experiments. It was shown, that silica-nanoparticles as well as fine silica-particles adsorb selected cellular proteins. The protein-particle-complexes formed in less than 5 minutes and were stable for at least 16 hours. Due to the adsorption of proteins, silica-particles form a protein corona in cell lysate, whose composition is dependent on the size of the silica-particles.

Fluorescently-labeled silica-nanoparticles could be localised within the intestine of treated *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites. An alteration of the lifespan of hermaphrodites, induced by silica-nanoparticles, could not be observed. Nematodes that were treated with silica-nanoparticles, however, showed a reduction in progeny production and a simultaneous increase of the egg-laying phenotype “bag-of-worms” (BOW), which is characterised by unlaied eggs that develop and hatch intracorporally. Both effects occurred independent of whether nematodes have been treated with silica-nanoparticles from the last larval stage (L4) or as adults. Thus, the silica-nanoparticles do not interfere with the development of *Caenorhabditis elegans*. In silica-nanoparticle treated nematodes, the age-related BOW-phenotype partly appeared two days earlier than in untreated animals. In morphological studies, that referred to the egg-laying relevant muscles and motorneurons, no specific silica-nanoparticle induced tissue changes were determined. The hermaphrodites that were treated with silica-nanoparticles exhibit a modulated egg-laying behaviour, that can be explained by the restricted neuromuscular function of the egg-laying apparatus.

This work shows that fine and nanoscale silica-particles form a protein corona in cell lysate, whose composition varies dependent on the particle size. The treatment of *Caenorhabditis elegans* with silica-nanoparticles leads to reproductive senescence. Furthermore, silica-nanoparticle treatment inhibits the egg-laying behaviour, what can be observed by the premature increase of the age-related BOW-phenotype.

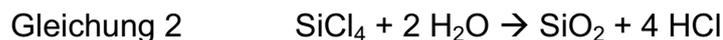
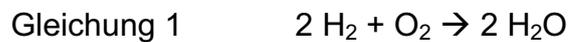
1 Einleitung

1.1 Silica-Nanopartikel

1.1.1 Zusammensetzung, Verbreitung, Herstellung

Siliciumdioxid (SiO_2) ist in verschiedenen Formen ein Hauptbestandteil der Erdkruste. Zu den natürlichen kristallinen Vorkommen zählen neben Quarz auch viele Minerale wie beispielsweise Cristobalit und Tridymit. Zusätzlich zu den kristallinen Formen kommen auch nichtkristalline, also amorphe, Formen wie beispielsweise Opal vor. Dem gegenüber stehen synthetisch hergestellte, meist amorphe Materialien aus Siliciumdioxid die mit dem Begriff Synthetisches amorphes Silica zusammengefasst werden. Synthetisches amorphes Silica wird im großtechnischen Maßstab hergestellt. Die weltweite jährliche Produktion übersteigt 1 Mt (Mayr et al. 2006). Es handelt sich dabei auch um nanoskalige, d. h. in mindestens einer Dimension unter 100 nm messende, Partikel, die bereits seit Jahrzehnten industrielle Bedeutung haben. Nanoskalige Silica-Partikel werden als Additive in der Kunststoffindustrie eingesetzt. Eine weitere Verwendung von Silica-Nanopartikeln findet sich bei Präzisionspoliertechniken in der Halbleiterindustrie. Daneben werden Silica-Nanopartikel auch als Füllstoffe, u. a. auch in Zahnfüllungen benutzt. In Drucker-Toner und als Papierbeschichtung sind Silica-Nanopartikel auch im Büro zu finden. Weiterhin sind Silica-Nanopartikel Bestandteil von Farben und Kosmetika. Unter der Nummer E551 sind Silica-Partikel unabhängig von ihrer Größe als Lebensmittelzusatzstoff zur Erhaltung der Rieselfähigkeit und als Trennmittel zugelassen und kommen beispielsweise in Ketchup und raffiniertes Speisestärke vor (Mayr et al. 2006; Kaluza et al. 2006). Darüber hinaus werden biomedizinische und biotechnologische Verfahren entwickelt, in denen Silica-Nanopartikel für die Krebstherapie, DNA Transfektion, als Wirkstofftransporter und zur Immobilisierung von Enzymen eingesetzt werden (Moghimi et al. 2005; Hirsch et al. 2003; Slowing et al. 2008; Vijayanathan et al. 2002)

Generell wird bei synthetischem amorphen Silica nach dem Herstellungsverfahren unterschieden. Silica-Partikel können durch nasschemische oder pyrogene Verfahren produziert werden. Beim pyrogenen Verfahren werden flüchtige Silane, hauptsächlich Siliciumtetrachlorid (SiCl_4), in einer Knallgas-Flamme bei Temperaturen über $1000\text{ }^\circ\text{C}$ oxidiert. Bei diesem Prozess wird SiCl_4 kontinuierlich verdampft und zunächst mit trockener Luft dann mit Wasserstoff vermischt, und in einem Reaktor zu Siliciumdioxid (SiO_2) hydrolysiert. Innerhalb des Reaktors folgt dann das Wachstum und die Aggregation der pyrogenen Silica-Partikel. Die dabei ablaufenden chemischen Reaktionen werden wie folgt beschrieben:



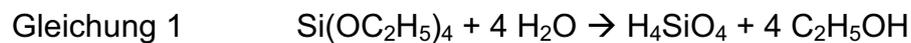
Über Prozessparameter wie Eduktnachführung, Flammzusammensetzung und Flammentemperatur können die chemisch-physikalischen Eigenschaften der entstehenden Silica-Partikel variiert werden. Etwa 18% der im Jahr 2000 in Westeuropa produzierten synthetischen amorphen Silica-Partikel wurden nach diesem Verfahren hergestellt (Napierska et al. 2010; Mayr et al. 2006).

Bei den nasschemischen Verfahren wird überwiegend Wasserglas als Ausgangsstoff verwendet. Wasserglas ist eine wässrige Lösung von Natriumsilikat ($\text{Na}_2\text{O} \cdot n\text{SiO}_2$; $n=2-4$). Bei Zugabe von Schwefelsäure (H_2SO_4) fallen in neutralen oder basischen Bedingungen Silica-Partikel aus. Die Reaktion kann wie folgt beschrieben werden:

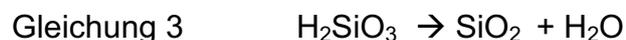


Abhängig von den Prozessbedingungen (Temperatur ($40-95^\circ$), pH ($4,5-12,5$), Durchfluss, Reaktionszeit und Reaktorgeometrie) werden die Eigenschaften der präzipitierten Silica-Partikel bestimmt. Im weiteren Produktionsprozess werden diese getrocknet. Nach dieser Methode werden etwa 72% der gesamten Silica-Partikel in Europa produziert. Neben Silica-Partikeln in Pulverform können Silica-Partikel auch als Sol hergestellt werden. Kolloidale Dispersionen von festen oder flüssigen Stoffen,

die in feinsten Verteilung in einem flüssigen oder gasförmigen Stoff vorliegen, werden als Sol bezeichnet. Hingegen ist ein Gel ein Festkörper der aus mindestens zwei Phasen besteht, wobei eine feste Phase ein Netzwerk bildet, das eine flüssige Phase unbeweglich macht. Silica-Sol kann einerseits durch direkte Hydrolyse von monomerem Siliciumtetrachlorid (SiCl_4) in wässriger Lösung und anschließende Kondensation der Silica-Partikel zum Sol hergestellt werden. Alternativ kann verdünntes Wasserglas als Edukt für Silica-Sol dienen (Mayr et al. 2006). Eine dritte Möglichkeit verwendet als Ausgangsstoff Tetraethylorthosilikat und wurde 1968 von Stöber, Fink und Bohn beschrieben (Stöber et al. 1968). Das Partikelwachstum läuft in einem Sol-Gel Prozess ab. Ein Sol kann bei bestimmten Bedingungen in ein Gel übergehen. Für die Herstellung von Silica-Partikeln wird das System als Sol erhalten. Ein Sol entsteht beim Stöber-Prozess durch Hydrolyse und Kondensation von Tetraethylorthosilikat ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) in einem Medium aus Ethanol und Wasser, dem zusätzlich Ammoniumhydroxid als Katalysator beigemischt wird. Die dabei verlaufenden Reaktionen werden wie folgt beschrieben:



Die gebildete Orthokieselsäure (H_4SiO_4) reagiert dabei unter Ausbildung von Si-O-Si Bindungen und Abspaltung von Wasser weiter zu Siliciumdioxid. Dieser Prozess wird durch die Hydroxid-Ionen aus dem Ammoniumhydroxid katalysiert.



Bei einem pH-Wert > 7 führt die fortlaufende Kondensation des Tetraethylorthosilikats unter Wasser- oder Alkoholabspaltung zu einem Anwachsen der Silica-Partikel. Im Vergleich zu den bereits beschriebenen, im Präzipitationsverfahren hergestellten Silica-Partikeln (Fällungskieselsäuren) fallen die im Stöber-Prozess hergestellten Silica-Partikel insbesondere durch ihre ideale kugelige Form

(Sphärizität) und durch die geringe Verteilungsbreite des Partikeldurchmessers auf. Die Autoren (Stöber et al. 1968) gaben dabei eine mögliche Größenordnung von 50 nm bis 1,5 µm an. Der Stöber-Prozess wurde seit der ersten Beschreibung weiter modifiziert, um den Erfordernissen an die so entstehenden Silica-Partikel Rechnung zu tragen. So kann das Verhältnis des Wasseranteils zum Anteil von Tetraethylorthosilikat in der Reaktion darüber bestimmen, ob die Partikeloberfläche glatt oder mit Mikroporen versehen ist (Vanblaaderen und Kentgens 1992). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Silica-Partikel wurden, laut Angaben des Herstellers, allesamt nach einem modifizierten Stöber-Prozess produziert. Ferner weisen sie eine sphärische Form mit einer glatten Oberfläche und terminalen Si-OH Sequenzen auf, die in wässrigen Lösungen bei pH 7 mit mehreren Wasserschichten belegt ist.

1.1.2 Interaktionen von Silica-Nanopartikeln *in vitro*

Die Interaktionen die sich zwischen Kolloiden, wie beispielsweise Silica-Partikeln in einem Sol, und dem umgebenden Dispersionsmedium ergeben sind bestimmt von den Eigenschaften der Konstituenten des Systems. So ist die Größe des Kolloid ein entscheidender Faktor. Die Nanotechnologie, die bereits seit Jahrzehnten resant expandiert, basiert auf der Entdeckung, dass sich nanoskalige Materialien in manchen Eigenschaften anders verhalten als Materialien im Mikromaßstab. Die zunehmende Verbreitung von Nanomaterialien führt zwangsläufig auch dazu, dass diese auch mit biologischen Systemen interagieren. Die an der Nano-Bio-Schnittstelle auftretenden Interaktionen werden durch hydrodynamische, elektrodynamische, elektrostatische und sterische Wechselwirkungen sowie durch Lösemittel- und Polymerbrückeninteraktionen bestimmt (Nel et al. 2009). Hydrodynamische Wechselwirkungen ergeben sich daraus, dass biologische Medien, grundlegend betrachtet, wässrige Lösungen von Biomolekülen sind, und (nanoskalige) Partikel in diesem Medium beweglich sind. Elektrodynamische Wechselwirkungen basieren auf van-der-Waals Kräften, also schwachen nicht-kovalenten Wechselwirkungen von Materie mit einer Reichweite von etwa 1 bis 100

nm. Die elektrische Ladung von Partikeln und den umgebenden Molekülen bestimmt ihre elektrostatischen Wechselwirkungen. Ferner können die hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften von Partikeln Einfluss auf deren Interaktionen mit Biomolekülen nehmen. Die von Partikeln in biologischen Medien adsorbierten Moleküle können wiederum, beispielsweise an Membranen, zu veränderten Interaktionen führen. Partikel, die nicht mit Biomolekülen belegt sind, können anders mit Membranrezeptoren interagieren als Partikel, die Biomoleküle adsorbiert haben. Biologische Moleküle, die interagieren können, sind unter anderem Proteine, Lipide oder DNA.

Es ist bekannt, dass Partikel in biologischen Medien durch Adsorption eine Proteinhülle ausbilden. Diese, als Proteincorona bezeichnete Schicht, kann dann die primären Partikeleigenschaften hinsichtlich Ladung, der hydrodynamischen Größe oder den Aggregationseigenschaften verändern. Die grundlegenden Mechanismen der Interaktion von Partikeln mit Proteinen werden anhand von einzelnen gelösten Proteinen oder von Proteinen im Blut erforscht. So konnte gezeigt werden, dass Silica-Nanopartikel mit Durchmessern von 4 bis 100 nm mit Hühner-Lysozym interagieren. Während die Autoren für die 4 nm Silica-Nanopartikel die Bildung von molekularen Komplexen beschreiben, zeigt sich, dass 20 nm und 100 nm Silica-Nanopartikel Lysozym adsorbieren. Außerdem konnten die Autoren beobachten, dass, in Abhängigkeit von der Größe der Silica-Nanopartikel, der Anteil α -helikaler Strukturen im Lysozym abnimmt (Vertegel et al. 2004). Für das Protein HCAI (human carbonic anhydrase I) wurde ein Gleichgewicht der Adsorption an Silica-Nanopartikel im Bereich von etwa 10 Minuten beschrieben (Lundqvist et al. 2004). In einer Studie, in der bioabbaubare 312 nm poly(D,L-Laktat)-Partikel in Citrat-Plasma inkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass das vorrangig adsorbierte Protein Immunglobulin G ist. Ferner wurde bei der Inkubation dieser Partikel zunächst Albumin adsorbiert, im Verlauf der Inkubation jedoch wieder desorbiert. Der Anteil an adsorbierten Apolipoprotein E nahm mit längerer Inkubationsdauer jedoch zu (AlléAemann et al. 1997). Diese Protein-Adsorption, auch als Proteincorona-Bildung bezeichnet, wurde beispielsweise in einer weiteren Studie hinsichtlich Kinetik und

Stöchiometrie in Modellsystemen mit Albumin oder Fibrinogen und N-isopropylacrylamide (NIPAM): N-tert-butylacrylamide (BAM) copolymer Nanopartikeln untersucht (Cedervall et al. 2007). Insgesamt wird bei der Bildung der Proteincorona zwischen einer langlebigen (harten) und einer kurzlebigen Zusammensetzung unterschieden.

Hinsichtlich der Interaktionen von Partikeln mit DNA wird hauptsächlich dahingehend geforscht, diese als Gentransportsysteme einzusetzen. Hierbei werden Nanopartikel aus Gold (Ghosh et al. 2008), Calcium Phosphat (Fu et al. 2005) aber auch Silica eingesetzt. Dabei muss beachtet werden, dass Silica-Nanopartikel in wässrigen Medien bei pH \sim 7 üblicherweise ein negatives Zeta-Potenzial aufweisen, d. h. als Partikel mit Hydrathülle eine negative Ladung besitzen. Um die Bindung der negativ geladenen DNA zu ermöglichen, muss also die Oberfläche der Silica-Nanopartikel mit positiv geladenen Molekülen funktionalisiert werden. Typischerweise wird hierbei Poly-L-Lysin (PLL) oder Polyethylenimin (PEI) verwendet (Hom et al. 2009). Ein Vorteil für den Gentransport wird in porösen (mesoporen) Silica-Nanopartikeln gesehen. Eine Studie, in der aminierte mesopore Silica-Nanopartikel mit großen Poren (> 15 nm) verwendet wurden, zeigt, dass im Vergleich zu Partikeln mit kleinen Poren (~ 2 nm), eine höhere Transfektionseffizienz erreicht wurde (Kim et al. 2011).

In vitro Interaktionen von Silica-Nanopartikeln mit Lipiden werden vornehmlich anhand von sogenannten unterstützten Lipid-Doppelschichten (engl. supported lipid bilayer: SLB) studiert. Hierbei werden Partikel mit ihrer Hydrathülle von einer Lipid-Doppelschicht umschlossen. Es ist erwiesen, dass SLB viele der Charakteristika von Zellmembranen, wie laterale Fluidität oder Inkorporation von Proteinen, wiedergeben (Roiter et al. 2009). Im Jahr 2005 konnte erstmals gezeigt werden, dass sich SLB auch um Stöber-Partikel mit einem Durchmesser von etwa 110 nm bilden (Mornet et al. 2005).

1.1.3 Biologische Effekte von Silica-Nanopartikeln

Effekte von Silica im Allgemeinen werden bereits seit langem untersucht. Im Focus dieser Forschung standen dabei vor allem die Effekte des „natürlichen“ kristallinen Quarz. Die eindeutige Verbindung der berufsbedingten Exposition von kristallinem Siliciumdioxid in Form von Quarz- bzw. Cristobalitstaub und schweren Erkrankungen des respiratorischen Systems, auch Lungenkrebs, führte dazu, dass diese beiden Siliciumdioxid-Formen 1997 seitens der IARC (International Agency for Research on Cancer) als kanzerogen eingestuft wurden (IARC 1997). Die durch chronische Inhalation von kristallinem Siliciumdioxid ausgelöste Lungenreaktion ist Silikose, eine fortschreitende Pneumokoniose. Bei Patienten kommt es zu knotenartigen Bindegewebebildungen (Granulome). Darin finden sich Silicapartikel umgeben von gewundenen Collagenfasern und in der Peripherie: Macrophagen, Lymphocyten und Fibroblasten (Napierska et al. 2010). Die Mechanismen der Kanzerogenität sind noch nicht vollkommen verstanden, jedoch ergeben sich Hinweise auf die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species: ROS) (Fubini und Hubbard 2003).

Im Vergleich zur kristallinen Form von Siliciumdioxid wurden die Effekte der amorphen Form deutlich weniger untersucht (IARC 1997). Es gibt jedoch Hinweise, dass manche amorphe Silicapartikel gesundheitsgefährdend sein können. So wurde von Pneumokoniose bei Arbeitern berichtet, die berufsbedingt amorphem Silicastaub ausgesetzt waren (Vitums et al. 1977). Bei anderen dokumentierten Fällen kann Pneumokoniose nicht mit Sicherheit mit amorphem Silica in Verbindung gebracht werden, weil bei der Exposition auch kristallines Silica vorkam (Merget et al. 2002).

Mit zunehmender Verbreitung der Nanotechnologie und dem Einsatz von nanoskaligen Partikeln in einer weitreichenden Produktpalette, hat sich auch die toxikologische Forschung um die Nanotoxikologie erweitert. Generell zeigten nanoskalige (< 0,1 μm) Partikel aus Kohlenstoff (carbon black), Polystyrol oder Nickel bei gleicher Masse stärkere inflammatorische Effekte als feine (< 2,5 μm) Partikel (Li et al. 1999; Nemmar et al. 2003; Zhang et al. 2003). Somit sind aufgrund

der besonderen Eigenschaften (beispielsweise kleine Größe und daraus resultierende große spezifische Oberfläche; Zellpenetration) stärke biologische Effekte auch bei nanoskaligen Silica-Partikeln anzunehmen. Studien die die Effekte von Silica-Nanopartikeln im Tiermodell untersuchen, umfassen Untersuchungen an Mäusen und Ratten die durch Inhalation, intratracheale Instillation (Einbringen einer Partikelsuspension in die Luftröhre), Injektion oder Fütterung exponiert werden (Napierska et al. 2010). So zeigten Ratten die intratracheal mit Silica-Staub instilliert wurden, einen bzw. zwei Monate nach der Behandlung unterschiedliche Stadien der Silikose. Die Silikose wird in Schweregrade von Stadium I (lokal) bis IV (fortgeschritten) eingeteilt. Während Tiere die mit nanoskaligem Silica-Staub nach einem oder zwei Monaten Silikose Stadium I aufwiesen, wurde bei der mit feinem (0,5-10 μm) Silica-Staub behandelten Gruppe nach einem Monat Stadium II – II+ und nach zwei Monaten Stadium II+ - III festgestellt (Chen et al. 2004). In einer anderen Studie in der Ratten durch Inhalation eines Aerosols von amorphem colloidalen Silica (Ludox ®) exponiert wurden, zeigten sich Entzündungserscheinungen der Lunge. Nach etwa 40-50 Tagen nach der Exposition waren die Lungen frei von Silica (Lee und Kelly 1992). Nach Fütterung von 30 nm bzw. 30 μm Silica-Partikeln in 1%igen Nahrungs-Anteil an Mäuse über einen Zeitraum von zehn Wochen konnten die Autoren einer weiteren Studie bei der 30 nm-Gruppe ein Fettleber-Phänomen feststellen. Biochemische und hämatologische Untersuchungen des Blutes ergaben, bis auf die Erhöhung des Werts für Alanin-Aminotransferase bei der 30 nm-Gruppe, keine Unterschiede zwischen unbehandelten und Silica behandelten Tieren (So et al. 2008). Die intravenöse Injektion von 75 nm amorphen Silica-Partikeln in Dosen von 30 mg/kg Körpergewicht führte bei Mäusen zu Leberschäden, während Silica-Partikel mit 311 nm bzw. 830 nm mittlerem Durchmesser auch bei Gabe von 100 mg/kg Körpergewicht keinen Effekt zeigten (Nishimori et al. 2009). Die vorangegangene Aufzählung umfasst nicht alle zu diesem Thema veröffentlichten Studien. Insgesamt ist jedoch wenig zu diesem Thema bekannt.

Die Effekte von Silica-Nanopartikeln werden auch im Rahmen von Zellkulturexperimenten untersucht. Hierbei werden sowohl immortalisierte Zelllinien als auch primäre Zellen verschiedener Spezies verwendet. In Studien in denen Silica-Partikel verschiedener Durchmesser eingesetzt wurden, zeigten sich mit den jeweils kleineren (nanoskaligen) Partikeln die stärkeren Effekte (Yu et al. 2009; Yang et al. 2010). Die Effekte umfassen u. a. ROS Induktion, DNA Schäden oder Apoptose. Teilweise wird auch von je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägten Effekten berichtet (Chang et al. 2007; Choi et al. 2009). Auch nicht akut toxische Effekte, wie die Reduktion der Proliferation, werden berichtet (Nabeshi et al. 2010). Ein weiterer Silica-Nanopartikel induzierter Effekt ist die Umverteilung des nucleoplasmatischen Proteins Topoisomerase I in nucleäre Aggregate (Chen und von Mikecz 2005). Bei dieser Studie wurden zum Teil fluoreszenzmarkierte Silica-Nanopartikel in Größen von 70 nm bis 5 µm verwendet. Alle Silica-Partikel wurden von epithelialen Zellen (HEp-2) aufgenommen. Die Silica-Partikel mit mittlerem Durchmesser von 200 nm bis 5 µm lokalisierten dabei im Cytoplasma, während die 70 nm Silica-Nanopartikel im Nucleus nachweisbar waren. Dabei wurde festgestellt, dass die nucleäre Lokalisation der Silica-Nanopartikel zur Umverteilung des Proteins Topoisomerase I führte. Topoisomerase I ist ein Chromatin-assoziiertes Protein, das die bei der Transkription und Replikation auftretenden topologischen Probleme in der DNA löst, indem es vorübergehend und reversibel Einzelstrangbrüche induziert und so die Relaxation des DNA-Strangs ermöglicht (Champoux 2001). Topoisomerase I lokalisiert nach der Behandlung mit Silica-Nanopartikeln in aberranten nucleoplasmatischen Protein-Aggregaten, die zusätzlich Signaturproteine nucleärer Domänen, wie beispielsweise Fibrillarin (Nucleolus) oder PML (PML-Kernkörperchen) und mit Proteinaggregations-Erkrankungen assoziierte Proteine, wie beispielsweise Huntingtin (Huntington'sche Krankheit) enthalten ((Hemmerich und von Mikecz 2000; Sisodia 1998). Die Bildung dieser aberranten Protein-Aggregate inhibiert die Replikation, Transkription und Zell-Proliferation, moduliert jedoch nicht die Zellviabilität. Die aberranten, Silica-Nanopartikel induzierten Protein-Aggregate gleichen in ihrer Proteinzusammensetzung und den biochemischen Eigenschaften den polyQ-induzierten, neuronalen intranukleären Einschlüssen, wie

sie bei Tiermodellen der Huntington'schen Krankheit und Patienten mit der Huntington'schen Erkrankung auftreten (Chen und von Mikecz 2005; Chen et al. 2008; von Mikecz 2009). Ausgehend von diesen Ergebnissen, sollten in der vorliegenden Arbeit die *in vitro* Interaktionen von Silica-Partikeln mit zellulären Proteinen und ihre möglichen Effekte auf den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* untersucht werden.

1.2 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

1.2.1 Einführung

Als Modellorganismus für die biologische Forschung wurde *Caenorhabditis elegans* 1974 von Sydney Brenner vorgeschlagen und beschrieben (Brenner 1974). Systematisch wird *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) in das Phylum der Nematoda und dort in die Familie Rhabditidae eingeordnet (Schierenberg 2006). Als freilebende nicht-parasitische Art des Phylums Nematoda ernährt sich dieser im Boden lebende Fadenwurm von Mikroben, hauptsächlich Bakterien. *C. elegans* hat zwei Geschlechter: einen selbst-befruchtenden Hermaphroditen (XX) und Männchen (X0). Bei wild-typ Populationen treten Männchen sehr selten (0,1 %) durch spontane Chromosomenfehlverteilung (nicht-Disjunktion der Tochtergonosomen) in der Keimbahn der Hermaphroditen auf. Durch Paarung ergibt sich eine höhere Frequenz von bis zu 50% (Altun et al. 2002-2010). Abhängig von der Temperatur (16 - 25 °C) dauert der Lebenszyklus eines *C. elegans* Hermaphroditen ~90 bis ~47 Stunden (Byerly et al. 1976). Die Embryogenese kann in zwei Abschnitte unterteilt werden: die Proliferation und die Morphogenese. Etwa 100 Minuten nach der Fertilisation (bei 22 °C) besteht ein Embryo aus 8 Zellen. Die Gastrulation beginnt mit Einwanderung der Darmvorläuferzellen Ea und Ep. 150 Minuten nach der Fertilisation besteht der Embryo aus etwa 30 Zellen. Üblicherweise wird der Embryo bei diesem Stadium aus dem Uterus entlassen. Das Ende der Proliferation ist bei etwa 360 Minuten nach der Fertilisation erreicht. Der Embryo besteht dann aus den drei Keimblättern: Ektoderm, aus dem die synzytiale Hypodermis und die Neuronen entstehen; Mesoderm, aus dem der Pharynx und die Muskeln entstehen und Endoderm, aus dem die Gonaden

und der Darm entstehen. Mit dem Stadium Bohne beginnt die Morphogenese. Die Elongation beginnt bei etwa 400 Minuten nach der Fertilisation. Das Stadium Komma ist nach etwa 430 Minuten erreicht. Innerhalb eines Zeitraums von weiteren etwa 7 Stunden entwickelt sich der Embryo über die Stadien Kaulquappe, Pflaume und Brezel (3-fach elongiert) weiter und schlüpft (von Ehrenstein 1980; Sulston et al. 1983; Wood 1988a). Von den während der Embryogenese gebildeten 671 Nuclei sterben 113 durch Apoptose (programmierter Zelltod) im Laufe der Entwicklung zu einem Hermaphroditen (Sulston et al. 1983). Eine frisch geschlüpfte Larve enthält 558 Zellen bzw. Nuclei, von denen sich 51 während der post-embryonalen Entwicklung teilen (Sulston und Horvitz 1977; von Ehrenstein 1980). Bei einem ausreichenden Nahrungsangebot beginnt das normale post-embryonale Entwicklungsprogramm 3 Stunden nach dem Schlüpfen (Ambros 2000). Über die Larval-Stadien L1 bis L4 entwickeln sich die Nematoden zu einem adulten Hermaphroditen. Das Ende eines jeden Larval-Stadiums wird durch eine Häutung angezeigt, bei der die alte Cuticula abgestoßen und eine neue, Stadium-spezifische Cuticula gebildet wird (Altun et al. 2002-2010). Bei ungünstigen äußeren Bedingungen, wie Überbesiedlung, Hunger oder zu hoher Temperatur, können sich die Nematoden am Ende des L2d Stadiums zu einer Dauerform entwickeln, die als Dauerlarve bezeichnet wird und die normale dreiwöchige Lebensspanne achtfach überlebt (Cassada und Russell 1975). Bei günstigen äußeren Bedingungen entwickelt sich die L2 (bzw. die L2d) Larve zur L3 Larve. In der Mitte des L3 Stadium endet die bis dahin fortschreitende Expansion der Gonadenarme in die anteriore bzw. posteriore Richtung. Die Gonadenarme expandieren ab dann dorsal (Antebi et al. 1997). Während des L4 Stadiums wird die Gonadogenese abgeschlossen. Die distalen Gonadenarme führen ihre einander zugewandte Migration entlang der dorsalen Körperwandmuskeln bis fast zur Mittellinie fort (Antebi et al. 1997). Die L4 Larven zeigen die beginnende Gewebe-Morphogenese des Eiablage-Apparates, die im Stereomikroskop als heller Halbmond erkennbar ist. Bei der Häutung zum Adulten wird die Entwicklung des Eiablage-Apparates abgeschlossen (Greenwald 1997).

Der adulte Hermaphrodit hat 959 somatische Nuclei. Davon sind 302 Neuronen, 95 Körperwandmuskelzellen und 20 Darmzellen (Wood 1988b).

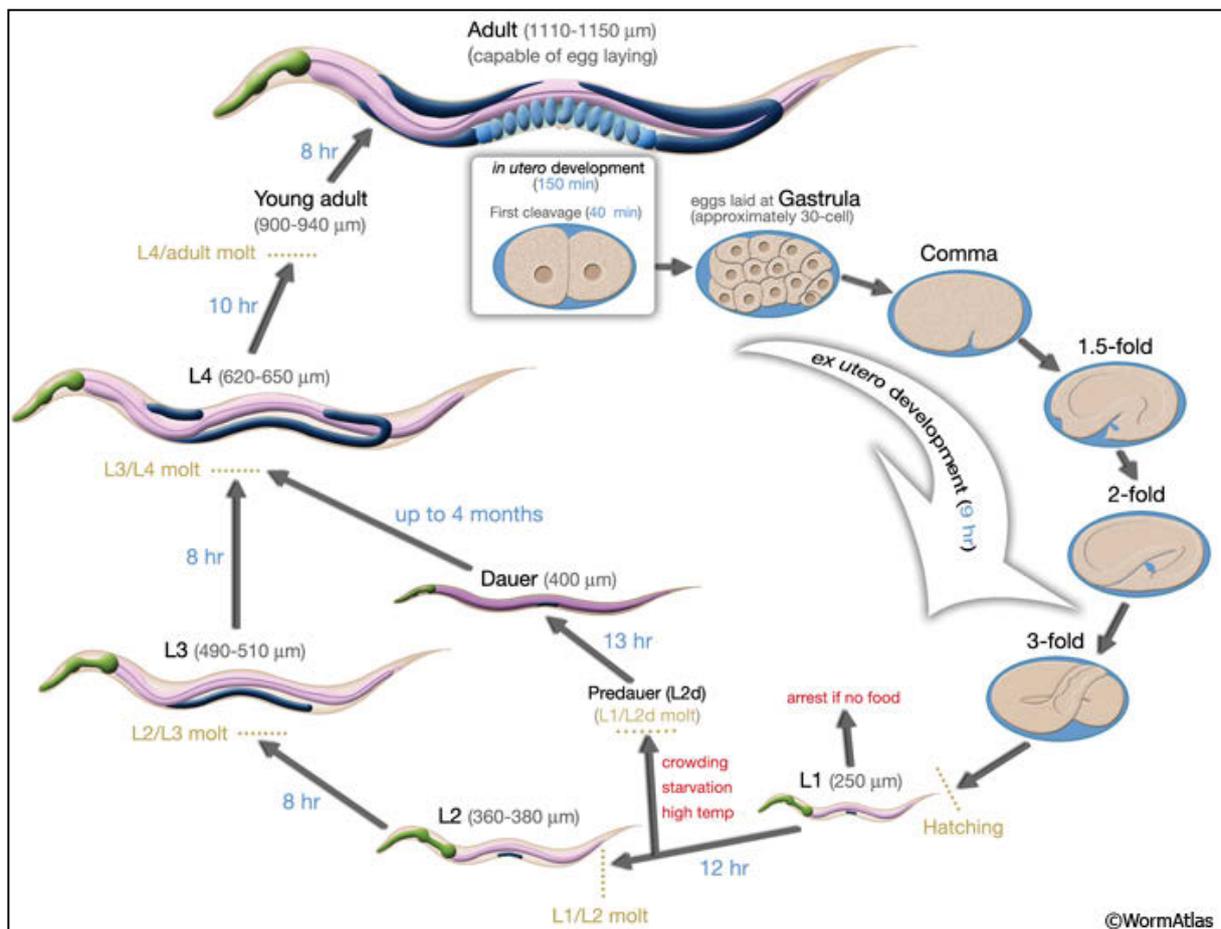


Abbildung 1.1 Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22 °C

0 Min entspricht der Fertilisation. Angaben in blau geben die Dauer der einzelnen Entwicklungsschritte an. Eier werden etwa 150 Minuten nach der Fertilisation während des Gastrula-Stage abgelegt. Neben den Bezeichnungen der Stadien finden sich die Längenangaben in μm. Entnommen aus www.wormatlas.org (Altun et al. 2002-2010)

Wie die Larval-Stadien, besitzen die adulten Hermaphroditen auch eine, hauptsächlich aus Collagen und Cuticulinen bestehende Cuticula, die dem Schutz vor äußeren Einflüssen dient. Die Cuticula umgibt die Hermaphroditen nicht nur von außen, sondern kleidet auch den Pharynx und das Rektum von innen aus. Sie wird von dem darunter liegenden Epithel, bei der Körperwand also der synzitalen Hypodermis, sekretiert. Die Cuticula der Körperwand kann in fünf Schichten unterteilt werden und hat eine Dicke von etwa 0,5 μm (Cox 1981; Altun et al. 2002-2010). Verschiedene Gewebe des *C. elegans* Hermaphroditen haben durch die Cuticula hindurch Kontakt nach außen. Die exkretorische Pore ist an der Mittellinie auf der ventralen Seite des Kopfes unterhalb des terminalen Pharynx-Bulbus lokalisiert und bildet den Ausführkanal des exkretorischen Systems, das aus fünf Zellen besteht und wahrscheinlich der Osmoregulation dient (Nelson und Riddle 1984). Außerdem ventral gelegen ist die Vulva und der Anus, die Uterus bzw. Rektum mit der Außenwelt verbinden. Weiterhin finden sich zwei cuticuläre Einstülpungen an den lateralen Lippen des Mauls für die Amphid-Sensillen. Deweiteren enthalten die Lippen Papillen für insgesamt 16 Mechanosensoren. Es finden sich weitere jeweils zwei Papillen anterior und posterior. Außerdem gibt es zwei Cuticula-Öffnungen lateral am Schwanz für die Phasmid Sensillen (Altun et al. 2002-2010). Insgesamt stehen 26 chemosensorische Neuronen in direkter und acht chemosensorische Neuronen in indirekter Verbindung mit der Außenwelt (Melkman und Sengupta 2004). Neben dem Darm, sind die vorbenannten, mit der Außenwelt in Verbindung stehenden Gewebe, potenzielle Eintrittsmöglichkeiten für Noxen.

Wie bereits erwähnt, repräsentiert die Hypodermis das äußere Epithel des Nematoden. Bei *C. elegans* Hermaphroditen besteht die Hypodermis aus dem größten Körpersynzitiem *hyp-7*, fünf kleineren synzitalen Zellen im Bereich des Kopfs, drei mononucleären Zellen und einer synzitalen Zelle im posterioren Bereich. Das epitheliale System besteht zusätzlich noch aus Saum-Zellen, die die Hypodermis lateral unterbrechen. Von den Saum-Zellen werden die Alae gebildet (Altun et al. 2002-2010).

Das Nervensystem von *C. elegans* kann in zwei distinkte und unabhängige Teile unterschieden werden. Das große somatische Nervensystem wird beim Hermaphroditen von 282 Neuronen gebildet. Das pharyngeale Nervensystem besteht aus 20 Neuronen. Die beiden Nervensysteme sind über ein Paar von Interneuronen (RIP) miteinander verbunden. Die beiden Nervensysteme unterscheiden sich in ihrer Topologie. Die Neuronen des pharyngealen Nervensystems sind direkt zwischen den Pharynxmuskeln lokalisiert. Im Gegensatz dazu sind die Neuronen des somatischen Nervensystems samt ihrer Fortsätze zwischen der Hypodermis und den Körperwandmuskeln lokalisiert und teilen sich mit der Hypodermis eine Basal-Lamina, die die Trennung zu den Muskeln herstellt. Die Zellkörper der meisten Neuronen des somatischen Nervensystems sind in Ganglien im anterioren und posterioren Bereich lokalisiert. Das größte Neuropil bildet der Nervenring, der um den terminalen Bulbus des Pharynx angeordnet ist. Die meisten Fortsätze der Neuronen führen, entweder im ventralen Nervenstrang oder im dorsalen Nervenstrang zum Nervenring. (Ward et al. 1975; Sulston und Horvitz 1977; Sulston et al. 1983; White et al. 1986; Altun et al. 2002-2010).

Das Muskel-System in *C. elegans* besteht aus gestreiften Muskeln und nichtgestreiften Muskeln. Die Körperwandmuskeln sind (schief)gestreifte Muskeln und bestehen aus 95 mononucleären Muskelzellen. Die Grundeinheit des kontraktiven Apparats in Muskelzellen ist das Sarcomer. In gestreiften Muskeln sind mehrere Sarcomere hintereinander angeordnet, und führen so zu der gestreiften Erscheinung. In Analogie der Bezeichnungen bei gestreiften vertebraten Muskeln finden sich in *C. elegans* die (elektronen)dichten Körper (engl. dense body: DB) für die Z-Scheiben, in denen die dünnen Aktinfilamente verankert sind. Die dicken Myosinfilamente sind in der M-Linie verankert. Zwischen zwei DB befindet sich ein Sarcomer. Im Gegensatz zu quergestreiften vertebraten Muskeln, sind die benachbarten Sarkomere in den Körperwandmuskeln von *C. elegans*, bezogen auf die Längsachse des Muskels, nicht in einem Winkel von 90 ° sondern in einem Winkel von etwa 5 – 7° angeordnet. Die Ansatzpunkte der gestreiften Körperwandmuskeln an der Hypodermis sind gleichmäßig verteilt. Die 95 rhombus-

förmigen Körperwandmuskelzellen sind als gestaffelte Paare in vier längsverlaufenden Bündeln angeordnet. Diese Bündel werden in die vier Quadranten dorsal-links (DL) , dorsal-rechts (DR) , ventral-rechts (VR) und ventral-links (VL) unterteilt. Die drei erstgenannten bestehen aus jeweils 24 Muskelzellen während VL aus 23 Zellen besteht. Die nichtgestreiften Muskeln umfassen 20 Pharynxmuskeln, 2 somato-intestinale Muskeln, 1 Anusschließmuskel, 1 Anusdrückermuskel, 8 Vulvamuskeln, 8 Uterusmuskeln und die kontraktile Gonadenhülle. Im Unterschied zu den gestreiften Muskeln enthalten die nichtgestreiften Muskeln nur ein bzw. wenige wohl-strukturierte Sarkomere oder weit weniger strukturierte Myofilament-Netzwerke. In nichtgestreiften Muskeln die nur ein Sarkomer enthalten, wie den Pharynxmuskeln, dem Anusdrückermuskel und den Vulvamuskeln, sind die Ansatzpunkte, die die Verbindung zum Epithel oder der Basal-Lamina herstellen, an den jeweiligen Enden der Zellen zu finden. Bei der kontraktile Gonadenhülle und den Uterusmuskeln um², die weniger strukturierte Myofilament-Netzwerke aufweisen, befinden sich die Ansatzpunkte der Filamente zufällig verteilt in der Plasmamembran (Altun et al. 2002-2010). Eine Besonderheit besteht bei Nematoden darin, dass Muskelzellen Muskelarme in Richtung von Motorneuronen ausbilden wodurch die neuromuskuläre Innervierung durch Synapsen erreicht wird (Stretton 1976; Dixon 2005).

Der Verdauungstrakt von *C. elegans* kann in drei Teile unterteilt werden: Vorderdarm (Stomodeum aus Mundhöhle und Pharynx) , Mitteldarm (Darm) und Hinterdarm (Proctodeum aus Rectum und Anus in Hermaphroditen bzw. Kloake in Männchen). Der Verdauungstrakt besteht aus insgesamt 127 Zellen. Der Pharynx ermöglicht die Nahrungsaufnahme, indem er die Bakterien (und andere Bestandteile) in flüssiger Suspension über eine Pumpfunktion aufsaugt, konzentriert, mahlt und in den Darm transportiert. Beim Pharynx handelt es sich um ein eigenständiges epitheliales Organ, das aus 9 Epithel-, 20 Muskel-, 9 Marginal-, 4 Drüsen-, 6 Ventilezellen und 20 Neuronen besteht. Zur Körperhöhle wird der Pharynx durch eine Basal-Lamina begrenzt. Die zum Lumen gewandte, apikale Seite besitzt eine, von den Muskel- und Marginalzellen sekretierte Cuticula, die in mehreren Bereichen

spezialisierte Strukturen, wie „Klappen“, „Sieb“ oder „Mahlwerk“ ausgebildet. Der Pharynx besitzt einen anterioren Bulbus (Metacarpus) und einen terminalen (posterioren) Bulbus, die durch den Isthmus voneinander getrennt sind. Die Verbindung zum Darm erfolgt über ein Pharynx-Darm-Ventil, das von den sechs Ventilellen gebildet wird, die keine eigenen muskulären Elemente aufweisen. Direkt im Anschluss an das Ventil ist das Lumen des Darms stark geweitet, was den Rückfluss der Nahrung, durch den durch die Weitung resultierenden verringerten internen Druck, verhindern könnte. Der Darm besteht aus 20 Zellen, die zumeist jeweils in bilateral symmetrischen Paaren angeordnet, eine Röhre um ein Lumen bilden. Jedes dieser Paare bildet einen Ring (Ringe II bis IX), während der Ring am anterioren Ende (Ring I) von vier Zellen gebildet wird. Zur Körperhöhle ist der Darm durch eine Basal-Lamina begrenzt. Die Verbindungen zwischen den Darmzellen sind auf der apikalen Seite durch adherente Verbindungen (adherent junctions) versiegelt. Die apikale Membran der Zellen bildet viele Mikrovilli, die in einem starken, aus Intermediärfilamenten bestehenden Netzwerk des Cytoskeletts verankert sind. Die Darmzellen sekretieren Verdauungsenzyme ins Lumen und nehmen das prozessierte Material sowie Nährstoffe auf. Desweiteren produzieren die Darmzellen des Hermaphroditen Dotter, der durch die Körperhöhle zu den Oocyten gelangt. Zusätzlich hat der Darm noch eine Speicherfunktion, weil er große Mengen verschiedener, z. T. autofluoreszierender, Speichergranula enthält. Mit zunehmendem Alter der Hermaphroditen akkumulieren in den Darmzellen Lysosomen, die Lipofuscin enthalten. Die Darmzellen sind nicht direkt innerviert. Im äußerst posterioren Abschnitt sind die Darmzellen mit den zwei somato-intestinalen Muskeln assoziiert, die für die Darmentleerung verantwortlich sind. Das Proctodeum schließt sich an den Darm an. Es besteht aus insgesamt elf Zellen drei verschiedener Typen (Lehane 1997; Labouesse 2006; Altun et al. 2002-2010; White 1988; Gerstbrein et al. 2005).

Das reproduktive System der *C. elegans* Hermaphroditen wird in drei wesentliche Bestandteile unterteilt: somatische Gonade, Keimbahn und Eiablage-Apparat. Die somatische Gonade und die Keimbahn bilden zusammen zwei

symmetrische U-förmige Röhren bzw. Arme die durch den gemeinsamen Uterus und Eiablage-Apparat verbunden sind. Am jeweiligen Ende eines Gonadenarms befindet sich die distale-Spitzen-Zelle (engl. distal tip cell: DTC) die zusammen mit der Gonadenhülle, der Spermatheka, dem Spermatheka-Uterus-Ventil und dem Uterus die somatische Gonade bildet. Von diesen sind insbesondere die DTC und die Gonadenhülle bereits in der frühen postembryonalen Entwicklung eng innerhalb des Gonaden-Primordium mit der Keimbahn assoziiert. Die DTC ist eine einzelne große somatische Zelle die eine enge Hülle um etwa sechs bis zehn der äußerst-distalen Keimbahnzellen und mehrere lange (bis zu einer Länge des 20-fachen eines Keimbahnzellendurchmessers), tentakel-artige, dünne Cytoplasma-Arme um die Keimbahnzellen bildet. Die Basal-Lamina, die die gesamte Gonade umgibt, ist im Bereich der DTC verdickt. Die Gonadenhülle wird je Gonadenarm von fünf Paaren von Zellen gebildet, die die Gonade einschichtig umgeben. In den Bereichen wo zwei benachbarte Zellen über adherente Verbindungen und kommunizierende Verbindungen (gap junctions) verbunden sind, überlappen die Zellen. Außer das sie die Entwicklung der Keimbahnzellen reguliert, hat die Gonadenhülle auch eine kontraktile Funktion die die Ovulation ermöglicht. (Hall et al. 1999; McCarter et al. 1997; Killian und Hubbard 2004; Altun et al. 2002-2010). Die Spermatheka ist der Ort wo die Oocyten befruchtet werden. Es handelt sich dabei um eine Ziehharmonika-ähnliche Röhre die Spermien enthält. Die Spermatheka besteht aus insgesamt 24 Zellen die in zwei regionalen Gruppen organisiert sind. Distal bilden acht Zellen, in zwei Reihen arrangiert, einen engen Korridor. Proximal ist eine, aus 16 Zellen bestehende, weite, Sack-ähnliche Kammer zu finden. In Abwesenheit einer Oocyte ist das Lumen der Spermatheka eng, das Organ erscheint dann zusammengefallen. Die proximale Abgrenzung zum Uterus bildet das Spermatheka-Uterus-Ventil, das ein synziales Gewebe darstellt. (Kimble und Hirsh 1979; McCarter et al. 1997; Altun et al. 2002-2010) Der Uterus besteht aus zwei, anterior und posterior gelegenen, keulenförmigen Röhren, die über eine zentrale Kammer miteinander verbunden sind. Die Röhren werden durch je vier ringförmige, epitheliale Synzities ut-1 bis ut-4 gebildet. Die zentrale Kammer des Uterus wird dorsal von dem Epithelsynzitim utse und ventral von dem H-förmigen uterinen Saum-Synzitim utse und den

mononucleären Epithelzellen uv1 bis uv3 gebildet. Die letztgenannten Epithelzellen uv1-3 stellen hierbei die Verbindung zur hypodermalen Vulva her (Newman et al. 1996). Den nicht-somatischen Bestandteil des reproduktiven Systems bildet die Keimbahn. Sie produziert im Hermaphroditen männliche und weibliche Gameten: Spermien und Oocyten. Spermien werden während des letzten Larvalstadiums L4 produziert. Oocyten produziert der adulte Hermaphrodit. Hierbei weist die Keimbahn eine distal-proximal gerichtete Polarität auf. So stellt der distale Teil, etwa bis zur Wendeschleife, ein Synzidium dar. Die Oocyten im proximalen Teil sind hingegen mononucleär. Dafür, dass die in der Spermatheka fertilisierten und sich im Uterus bereits entwickelnden Embryonen die Außenwelt erreichen ist der Eiablage-Apparat verantwortlich. Der Eiablage-Apparat besteht, neben dem o. g. Uterus, noch aus den Uterusmuskeln, der Vulva, den Vulvamuskeln und einem lokalen Neuropil, das von den hermaphroditen-spezifischen Neuronen HSN L/R und VC1 bis VC6 gebildet wird (Altun et al. 2002-2010).

1.2.2 Nachkommenproduktion in *Caenorhabditis elegans* Hermaphroditen

Ein Teil der Nachkommenproduktion von *C. elegans* Hermaphroditen beginnt bereits während der postembryonalen Entwicklung. Alle Keimbahnzellen in *C. elegans* stammen von den Vorläuferzellen Z1 oder Z2 ab. Diese teilen sich mitotisch bereits ab dem L1 Stadium. Mit Auswachsen der Gonadenarme entfernen sich die proximal lokalisierten Keimbahnzellen von der DTC, was dazu führt, dass sie in die meiotische Teilung übergehen. Mit dem L3 Stadium sind diese Zellen im Pachytän und es wird transient Spermatogenese induziert. Über eine Modulation des Geschlecht-determinierungs-Signalwegs in den Keimbahnzellen werden anschließend nur weibliche Gameten gebildet (Ellis 2007). In der Mitte des L4-Stadiums sind je Gonadenarm etwa 37 meiotische Zellen in die Spermatogenese eingetreten. Während der Entwicklung zum Adultus entwickeln sich diese Zellen weiter zu Spermatisiden und akkumulieren im äußerst-proximalen Teil der Gonade. Mit der ersten Ovulation werden die Spermatisiden in die Spermatheka gedrückt und

entwickeln sich während der Spermiogenese schnell weiter zu Spermatozoen (Spermien) (L'Hernault 2006). Ein Hermaphrodit bildet je Gonadenarm etwa 150 Spermien, was pro Nematode eine maximale, selbst-fertilisierte Nachkommenschaft von 300 Embryonen zulässt (L'Hernault 1997). Im adulten Hermaphroditen lassen sich den Abschnitten der Gonade Entwicklungsstadien der Keimbahnzellen zuordnen. Im distalen Teil der Gonade befindet sich die mitotische Region. Durch den Einfluss der DTC wird hier, über den GLP-1 Signalweg, der Eintritt der Keimbahnzellen in die Meiose inhibiert (Hubbard und Greenstein 2005). Mit zunehmender Entfernung nimmt der Einfluss der DTC ab, und die Keimbahnzellen treten in die Meiose ein. Dieser Abschnitt wird als Übergangszone bezeichnet. Die Keimbahnzellen befinden sich im Leptotän bzw. Zygotän. Nachdem sie die Übergangszone passiert haben, sind sie im Pachytän, dies entspricht dem distalen Arm der Gonade, bis etwa zur Wendeschleife. Bis hier ist die Keimbahn ein Synzidium, die sogenannte Rachis. Der Ausstieg aus dem Pachytän benötigt die Aktivierung des MAP Kinase-Signalwegs. Das Aktivierungssignal wird seitens der Gonadenhüllenzellen in diesem Abschnitt vermutet (McCarter et al. 1997). Während der Oogenese stirbt im Bereich der Wendeschleife ein beachtlicher Teil (Schätzungen gehen von bis zu 50% aus) der Keimbahnzellen durch Apoptose. Die abgestorbenen Zellen werden durch die distalen Gonadenhüllenzellen aufgenommen (Hengartner 1997; Altun et al. 2002-2010). Die reifenden Oocyten im proximalen Teil der Gonade, kurz hinter der Wendeschleife treten ins Diplotän ein und wachsen. In diesem Abschnitt sind die Gonadenhüllenzellen permissiv für den Vorgang der Dotteraufnahme seitens der Oocyten. Weiter proximal füllen die einzelnen Oocyten das gesamte Lumen der Gonade aus und sind nacheinander aufgereiht. Sie befinden sich in der Diakinese. ((McCarter et al. 1999; Grant und Hirsh 1999). Die Oocyte die am nächsten an der Spermatheka anliegt wird durch das Spermien-Protein MSP (haupt Spermien Protein; engl. Major sperm protein: MSP) zur Maturation angeregt (Miller 2001). Die Diakinese wird verlassen und die Kernhülle wird abgebaut. Nach etwa fünf Minuten folgt die Ovulation. In der Spermatheka wird die Oocyte befruchtet. Fünf Minuten später wird die Zygote in den Uterus entlassen und entwickelt sich als Embryo weiter (McCarter et al. 1999).

1.2.3 Das Eiablageverhalten von *Caenorhabditis elegans* Hermaphroditen

Die Eiablage stellt neben der Fortbewegung, der Nahrungsaufnahme und der Defäkation eine der wesentlichen, vom Nervensystem des *C. elegans* Hermaphroditen gesteuerten, motorischen Fähigkeiten dar. Für die Eiablage ist die richtige Funktion des Eiablage-Apparats unabdingbar. Der Eiablage-Apparat besteht aus Epithelzellen, Muskeln und Neuronen. Die Entwicklung des Eiablage-Apparats beginnt im Embryo und wird mit der letzten Häutung von der L4 Larve zum Adultus abgeschlossen. Dabei sind es die HSN Neuronen, die bereits im Schwanzbereich des Embryos geboren werden und anschließend in die Nähe des Gonaden-Primordiums migrieren (Sulston und Horvitz 1977; Sulston et al. 1983; Desai et al. 1988). Die VCn –Neuronen werden in der L1 Larve geboren. Beide Neuronen-Typen bilden während der weiteren Entwicklung Fortsätze (Altun et al. 2002-2010). Die Vorläuferzellen der Uterus- und Vulvamuskeln, die Myoblasten SML/R werden in der L1 Larve gebildet. Ab der L2 Larve migrieren die SM-Myoblasten an die Stelle, wo später die Vulva entstehen wird. Dort teilen sie sich dreimal und bilden so, in der L4 Larve, die Geschlechtsmuskeln (Sulston und Horvitz 1977; Altun et al. 2002-2010). Die Vulvavorläuferzellen (engl. vulva precursor cell: VPC) werden in der L1 Larve gebildet. Die Zellteilungen der VPCs und die Vulvamorphogenese beginnen am Übergang von der L3 zur L4 Larve. Der Uterus, dessen Vorläuferzellen in der L2 Larve gebildet wurden, entwickelt sich parallel ab dem L3 Stadium. Im L4 Stadium wird die Verbindung zwischen Uterus (Zellen uv1 bis uv3) und Vulva hergestellt. Während des späten L4 Stadiums verbinden sich die Vulvamuskeln mit dem Vulvagewebe. Die Neuronen bilden in diesem Stadium das lokale Neuropil (Altun et al. 2002-2010; Sulston und Horvitz 1977; Adler et al. 2006). Der Eiablage-Apparat im adulten Hermaphroditen besteht aus acht Uterusmuskeln (um1L/R; um2L/R jeweils anterior und posterior), acht Vulvamuskeln (vm1L/R; vm2L/R jeweils anterior und posterior), acht Motoneuronen (HSNL/R; VC1 bis VC6), dem Uterus und der hypodermalen Vulva. Die einzigen Muskeln dieses Organs, die von den Motoneuronen über Synapsen angesteuert werden, sind die vm2 Vulvamuskeln. Sie sind an ihren jeweiligen apikalen Enden X-förmig mit der Vulva verbunden und

weisen kommunizierende Verbindungen (gap junctions) mit den vm1 und um1 Muskeln auf (White et al. 1986). Die HSN Neuronen lokalisieren lateral und etwas nach posterior versetzt an der Vulva. Das HSN Axon bildet Synapsen mit den vm2 Muskeln und den VCn-Neuronen im lokalen Neuropil und expandiert weiter bis zum Nervenring. Die VCn-Neuronen lokalisieren ventral auf der Mittellinie am ventralen Nervenstrang (Schafer 2006; White et al. 1986; Altun et al. 2002-2010).

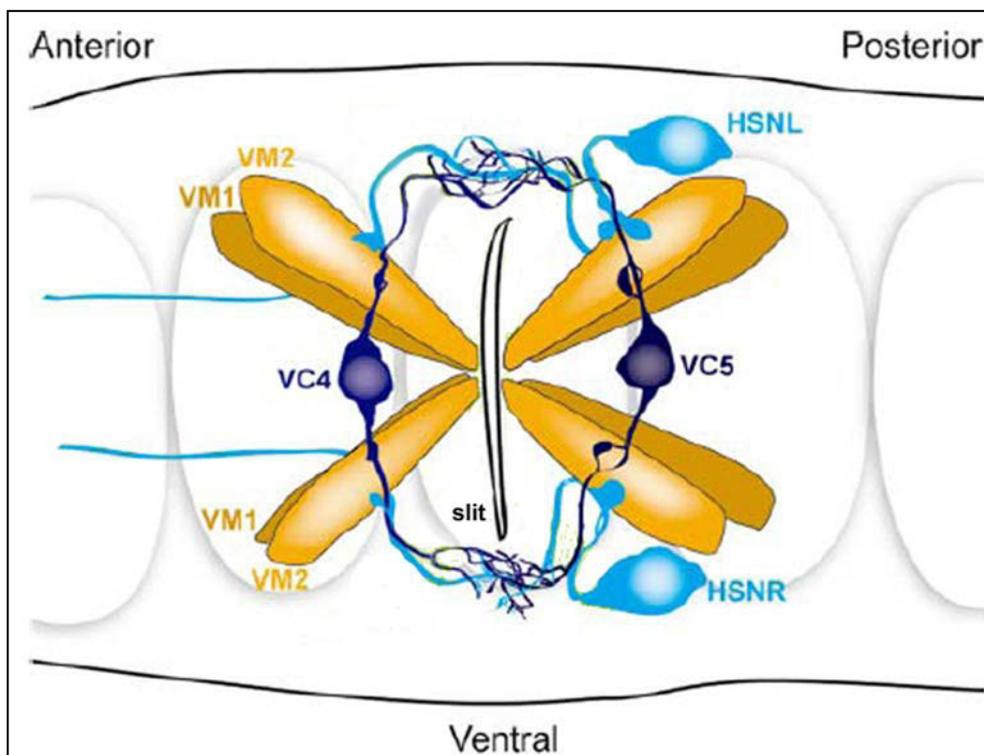


Abbildung 1.2 Anatomie der Eiablage-Neuromuskulatur

Ventrale Sicht auf den Eiablage-Apparat eines *C. elegans* Hermaphroditen. Die Vulvamuskeln sind in orange dargestellt. Die Motoneuronen in blau oder lila. Abbildung zeigt nur die vulva-proximalen VC- Neuronen VC4 und VC5. Entnommen aus (Schafer 2006); verändert.

Die VCn-Neuronen können in zwei Klassen unterteilt werden: vulva-proximal (VC4 und VC5) und vulva-distal (VC1 bis VC3, VC6). Die Axone der vulva-distalen VCn-Neuronen verlaufen entlang des ventralen Nervenstrangs bis zur Vulva, ab dann dorsal zum Neuropil. Die vulva-proximalen VC4 und VC5 haben kurze Fortsätze in den ventralen Nervenstrang und zu den vm2 Muskeln sowie dem Neuropil. Sie sind insgesamt verzweigter als die vulva-distalen Motoneuronen (Schafer 2006; Altun et

al. 2002-2010). In Ablationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die *vm2* Muskeln und die HSN Motorneurone für die Eiablage essentiell sind, während die Ablation der Uterusmuskeln oder der *vm1* Vulvamuskeln die Eiablage nicht vollständig unterdrückt (Trent et al. 1983; Schafer 2006).

Als Neurotransmitter verwenden die HSN Motorneuronen Serotonin (Desai et al. 1988), Acetylcholin (Duerr et al. 2001) und mindestens drei Neuropeptide, die von *flp-19*, *nlp-3* und *nlp-15* codiert werden (Forrester et al. 2004; Kim und Li 2004; Nathoo et al. 2001; Schinkmann und Li 1992). Die VCn-Motorneuronen sind cholinerg und exprimieren RF-amid-Neuropeptide (Duerr et al. 2001; Schinkmann und Li 1992). Die Vulvamuskeln exprimieren die von *ser-1* und *ser-7* codierten Serotoninrezeptoren sowie Acetylcholinrezeptoren (Schafer 2006).

Das Eiablageverhalten von Hermaphroditen wird durch verschiedene Umwelteinflüsse reguliert. So kann die mechanische Stimulation, wie beispielsweise Vibrationen des Kulturmediums, über die Mechanosensoren ALM und PLM die Eiablage inhibieren (Sawin ER. 1996; Zhang et al. 2008). Eindeutig konnte die Abhängigkeit der Eiablage von der verfügbaren Nahrung gezeigt werden. Bei ausreichendem Nahrungsangebot ist die Eiablage signifikant höher als bei Nahrungsmittelknappheit (Horvitz et al. 1982; Waggoner et al. 2000). Das Eiablageverhalten zeigt ein eindeutiges Zeitmuster, bei dem sich aktive Phasen von 1-2 Minuten Dauer mit inaktiven Phasen von etwa 20 Minuten abwechseln (Waggoner et al. 1998). Zusätzlich wird die Eiablage mit anderen Verhalten koordiniert. Unmittelbar vor einer Eiablage nimmt die Bewegungsgeschwindigkeit zu (Hardaker et al. 2001).

Weil die Eiablage für die Viabilität und Reproduktion nicht von Bedeutung ist, konnte eine Vielzahl von *C. elegans* Mutanten mit einem Eiablage-Phänotyp (engl. egg laying : Egl) isoliert werden. Bei Egl-defizienten Hermaphroditen ist die Eiablage vermindert, was dazu führt, dass Embryonen im Uterus zurückgehalten werden. Abhängig davon, wie lange die Eiablage inhibiert ist, kann dies bis zum bag-of-

worms (BOW) Phänotyp führen, bei dem die Embryos sich im Uterus zu Larven entwickeln und im Muttertier schlüpfen. Andererseits bewirkt eine erhöhte Eiablagereate (Egl-c(onstitutive)), dass weniger Eier im Uterus verbleiben und frühere Embryo-Entwicklungsstadien abgelegt werden.

2 Wissenschaftliche Fragestellung

Eine kanzerogene Wirkung von Silica-Partikeln in Form von kristallinem Quarzstaub ist wissenschaftlich erwiesen. Über die biologischen Wirkungen von amorphen Silica-Partikeln, insbesondere in nanoskaliger Größe, ist hingegen deutlich weniger bekannt. Weil amorphe Silica-Nanopartikel in unserer Umwelt, auch zunehmend in Produkten des täglichen Bedarfs, weit verbreitet sind, ergibt sich ein Wissensdefizit, das eine abschließende Bewertung dieses Materials nicht zulässt. Aus den bis jetzt veröffentlichten Studien ergeben sich jedoch Hinweise auf zellbiologische Effekte von amorphen Silica-Nanopartikeln. So konnte gezeigt werden, dass amorphe Silica-Nanopartikel in den Zellkern gelangen und zu abberanten Proteinaggregaten führen (Chen und von Mikecz 2005). Dieser Effekt geht einher mit der Inhibition der Genexpression und replikativer Seneszenz. Die abberanten Proteinaggregate gleichen in Proteinkomposition und biochemischen Eigenschaften den neuronalen intranukleären Einschlüssen, wie sie bei der Huntington'schen Erkrankung vorkommen (Chen et al. 2008). Um in diesem Zusammenhang die Effekte von amorphen Silica-Nanopartikeln weiter zu charakterisieren, sollten in der vorliegenden Arbeit ihre möglichen Interaktionen *in vitro* und Auswirkungen auf den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* erörtert werden. Im einzelnen galt es die folgenden Fragen zu beantworten:

- (1) Interagieren amorphe Silica-Partikel mit zellulären Proteinen *in vitro* und welche Rolle spielt dabei die Partikelgröße ?
- (2) Welche Effekte ergeben sich im Nematoten *Caenorhabditis elegans* nach Behandlung mit amorphen Silica-Nanopartikeln ?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Agar	Bacto BD (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Aceton (zur Synthese)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid (Stocklösung: 29%(w/v) Acrylamid, 1% (w/v) Bisacrylamid)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Aminosäuren, nicht-essentiell MEM	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe, Deutschland) Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Calciumchlorid, CaCl ₂	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Cholesterin	
4',6-Diaminidino-2-phenylindol -DAPI-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid -DMSO-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dithiotreitol -DTT-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
ECL-Reagenz	GE Healthcare (München, Deutschland)
Essigsäure (100%, Eisessig zur Analyse)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (absolut zur Analyse)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure -EDTA- Dinatrium-Salz	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fötale Kälberserum -FCS- (30 min bei 65°C inaktiviert)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Glutamin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hefeextrakt	Bacto BD (Heidelberg, Deutschland)
Instant Magermilchpulver	GRANOVITA (Lüneburg, Deutschland)
Kaleidoscope protein molecular weight marker	Bio-Rad (München, Deutschland)
Kaliumchlorid, KCl (zur Analyse)	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Material und Methoden

di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 (zur Analyse)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (zur Analyse)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat Heptahdrat, $MgSO_4 \times 7 H_2O$	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol (reinst)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumazid, NaN_3	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid, $NaCl$ (zur Analyse)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat -SDS-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumdeoxicholat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
di-Natriumhydrogenphosphat, $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhypochloritlösung 12%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pefabloc SC	Roche (Mannheim, Deutschland)
Penicillin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat -Tween 20-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ponceau S	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Proteose Pepton No. 3	Bacto BD (Heidelberg, Deutschland)
Pyruvat	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Rainbow™ coloured protein molecular weight marker	GE Healthcare (München, Deutschland)
Silica-Partikel, verschiedene Größen	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
Streptomycin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin -TEMED-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan -Trizma® Base-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid -Trizma® HCl-	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypanblau (0,4 % (w/v) in PBS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Das verwendete Wasser entstammt der Reinstwasseranlage HP 4 von TKA (Niederelbert, Deutschland).

3.1.2 Puffer und Lösungen

Ammoniumpersulphat-Stocklösung 10%(w/v) -APS-

1 g	Ammoniumpersulphat	(438 mM)
10 ml	H ₂ O	

Die Lösung wird zu je 300 µl aliquotiert und bei -20° C aufbewahrt.

Bleichelösung

0,3 ml	Natriumhypochloridlösung 12%
0,2 ml	4 M Natriumhydroxidlösung

Die Lösung wird jeweils unmittelbar vor dem Gebrauch angesetzt.

Coomassie-Gelfärbelösung

1,25 g	Brillant Blau R 250
50 ml	Eisessig
225 ml	H ₂ O
225 ml	Ethanol abs.

Die Lösung wird bis zur vollständigen Auflösung des Farbstoffs gemischt.

Aufbewahrung erfolgt bei Raumtemperatur.

Die für den Entfärbvorgang benötigte Entfärbelösung hat, bis auf die Zugabe des Farbstoffs, die gleiche Zusammensetzung.

Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese

3,0 g	Trizma® Base	(25 mM)
14,4 g	Glycin	(192 mM)
1,0 g	SDS	(3,5 mM)

Das SDS wird in ca. 100 ml Wasser bei etwa 70 ° C aufgelöst. Die restlichen Substanzen werden abgewogen und zunächst in 800 ml Wasser vollständig gelöst. Die SDS-Lösung wird hinzugefügt. Anschließend wird auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Der Puffer wird bei 4° C aufbewahrt.

LB-Medium

Fertigmischung von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben mit Wasser versetzen und autoklavieren. Das abgekühlte Medium wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Lösung A

0,5 g Cholesterin

werden in 100 ml ausolurem Ethanol gelöst. Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Lösung B

11,08 g CaCl_2

werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird autoklaviert. Die abgekühlte Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Lösung C

24,65 g MgSO_4

werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird autoklaviert. Die abgekühlte Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Lösung D

108,3 g KH_2PO_4

36,0 g K_2HPO_4

werden in 1000 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird autoklaviert. Die abgekühlte Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Lysepuffer

10 mM Tris (pH 7,5)

150 mM NaCl

10% (w/v) Glycerol

1% (w/v) NP-40

M9 Puffer

3,0 g KH_2PO_4

6,0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

5,0 g NaCl

1 ml 1 M MgSO_4

werden in einem Endvolumen von 1000 ml in Wasser gelöst.

Nematodenwachstumsmedium (NGM)

15 g	Agar	
2,25 g	NaCl	
1,9 g	Proteose No.3	
(3,75 g	Hefeextrakt → nur für angereichertes Medium: NGM+)	

Der Ansatz wird mit 750 ml Wasser versetzt und autoklaviert.
Nachdem der Ansatz auf ca. 60° C abgekühlt ist, werden hinzugefügt:

18,75 ml	Lösung D
0,750 ml	Lösung C
0,375 ml	Lösung B
0,500 ml	Lösung A

Das noch warme und flüssige Medium wird in Petrischalen nach Bedarf gegossen.

PBS

8,0 g	NaCl	(137 mM)
0,2 g	KCl	(2,7 mM)
0,77 g	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	(4,3 mM)
0,2 g	KH ₂ PO ₄	(1,5 mM)

Die Substanzen werden abgewogen und in 900 ml Wasser bis zur vollständigen Lösung der Salze gemischt. Anschließend erfolgt die Einstellung des pH-Wertes mittels NaOH auf 7,2. Es wird mit Wasser auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für sterile Anwendungen, wie beispielsweise Zellkultur, wird die Lösung sterilfiltriert.

PBS-Tween 20 0,5% (v/v) (1l)

5 ml	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat -Tween 20-
995 ml	PBS

Vor der Verwendung der Lösung muss das hochviskose Detergens vollständig gelöst sein. Die fertige Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Ponceau S-Färbelösung

2.5 g	Ponceau S	(6,5 mM)
5 ml	Essigsäure 100% (Eisessig)	(175 mM)

Die Substanzen werden gemischt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml eingestellt.

Proteinblock-Puffer mit 5%(w/v) Magermilchpulver

10 g Instant-Magermilchpulver
200 ml PBS-Tween 20 0,5%(v/v)

Das Milchpulver wird mit PBS-Tween auf 200 ml aufgefüllt und für mindestens eine Stunde vor dem Gebrauch auf einem Magnetrührer bis zur Auflösung gemischt.

Proteintransfer-Puffer

3,0 g Trizma® Base (25 mM)
14,4 g Glycin (192 mM)
200 ml Ethanol (3426 mM)

Die Substanzen werden mit 700 ml Wasser vollständig gelöst. Anschließend wird mit Wasser auf ein Endvolumen von 1 l eingestellt

RIPA Puffer

0,1% (w/v) SDS
1% (v/v) Triton X-100
1% (w/v) Natriumdeoxycholat
0,15M NaCl
10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
1mM EDTA

Unmittelbar vor Verwendung wird der Puffer mit 0,2 mg/ml Pefabloc SC versetzt.

Sammelgel (4%)

5,0 ml Sammelgel-Puffer
4,0 ml Wasser
1,8 ml Acrylamid-Stocklösung
100 µl Ammoniumpersulfat-Stocklösung
10 µl TEMED

Das Sammelgel wird unmittelbar vor dem Gebrauch frisch angesetzt.

Sammelgel-Puffer

30,3 g Trizma® Base (250 mM)
2,0 g SDS (7 mM)

Das SDS wird in ca. 100 ml Wasser bei etwa 70 ° C aufgelöst und anschließend abgekühlt. Die Puffer-Substanz wird in 800 ml Wasser gelöst und mit der SDS-Lösung vereinigt. Der pH-Wert wird mittels Salzsäure auf 6,8 eingestellt. Es wird mit Wasser auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

SDS Gel-Ladepuffer (2x)

100 mM	Trizma® HCl (pH 6,8)
200 mM	DTT
4% (w/v)	SDS
0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
20% (v/v)	Glycerin

Der Puffer wird zu je 1,5 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Trenngel (7%)

9,0 ml	Trenngel-Puffer
5,125 ml	Wasser
4,375 ml	Acrylamid-Stocklösung
180 µl	Ammoniumpersulfat-Stocklösung
18 µl	TEMED

Das Trenngel wird unmittelbar vor dem Gebrauch frisch angesetzt.

Trenngel (12%)

9,0 ml	Trenngel-Puffer
2,0 ml	Wasser
7,5 ml	Acrylamid-Stocklösung
180 µl	Ammoniumpersulfat-Stocklösung
18 µl	TEMED

Das Trenngel wird unmittelbar vor dem Gebrauch frisch angesetzt.

Trenngel-Puffer

90,8 g	Trizma® Base	(750 mM)
2,0 g	SDS	(7 mM)

Das SDS wird in ca. 100 ml Wasser bei etwa 70 ° C aufgelöst und anschließend abgekühlt. Die Puffer-Substanz wird in 800 ml Wasser gelöst und mit der SDS-Lösung vereinigt. Der pH-Wert wird mittels Salzsäure auf 8,8 eingestellt. Es wird mit Wasser auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zellkulturmedium

	500 ml	MEM Medium von Sigma (Steinheim, Deutschland)
+	50 ml	FCS
+	5ml	nicht-essentielle Aminosäuren (MEM 100x)
+	5ml	Natrium-Pyruvat (0,1 M)
+	5ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung (5000U/ml – 5000 µg/ml)

Bei jedem neuen Ansatz wird eine Sterilkontrolle mindestens vier Tage in einem CO₂-Inkubator bei 37° C inkubiert, bevor das Medium verwendet wird.

3.1.3 Antikörper

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper

Antikörper/ Klon	Spezifität	Isotyp	Titer	Herkunft
28LKS	Patientenserum gegen Topoisomerase 1	IgG	1:200 (WB)	Sklerodermie-Serenbank
	Kanninchenserum gegen Fibrillarin	IgG	1:200 (WB)	PD Dr. Peter Hemmerich (Jena, Deutschland)
	Kanninchen gegen NUMA	IgG	1:100 (WB)	Bethyl (Montgomery, TX, USA)
N-12	Kanninchen gegen TBP	IgG	1:500 (WB)	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)
1HU-4C8	Maus (monoklonal) gegen Huntingtin	IgG	1:400 (WB)	Milipore (Molsheim, Frankreich)
2MOD-1G6	Maus gegen HP1 γ	IgG	1:2000(WB)	EUROMEDEX (Souffelweyersheim, Frankreich)
PC10	Maus (monoklonal) gegen PCNA	IgG _{2a}	1:600 (WB)	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)
LBR	Kaninchen (monoklonal) gegen Lamin-B-Rezeptor	IgG	1:800 (WB)	BIOMOL (Hamburg, Deutschland)
MCP231	Maus (monoklonal) gegen α -Untereinheiten 1,2,3,5,6&7 des 20S Proteasoms	IgG ₁	1:100 (WB)	BIOTREND (Köln, Deutschland)
53ASR	Patientenserum gegen Sm B/B' und U1-70k	IgG	1:200 (WB)	Sklerodermie-Serenbank

Tabelle 2: Übersicht über die sekundären Antikörper

Antikörper	Kopplung	Titer
Ziegenserum gegen humanes IgG	Peroxidase	1:10000
Ziegenserum gegen murines IgG	Peroxidase	1:5000
Ziegenserum gegen Kaninchen-IgG	Peroxidase	1:10000

3.1.4 Silica-Partikel

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Silica-Partikel wurden, laut Angaben des Lieferanten, alle in einem modifizierten Stöber-Prozess hergestellt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Silica-Partikel

Bezeichnung	Mittlerer Durchmesser	Kopplung	Best.-Nr. Lieferant
Silica-Partikel 500 nm	500 nm	keine	PSi-0.5 Kisker
Silica-Nanopartikel (unm.)/ 50 nm	50 nm	keine	PSi-0.05 Kisker
Silica-Nanopartikel (rot)	50 nm	Tetramethylrhodamin- isothiocyanat (TRITC) 569 nm Abs/ 585 nm Em	PSi-R0.05 Kisker
Silica-Nanopartikel (grün)	50 nm	Fluorescein- isothiocyanat (FITC) 485 nm Abs/ 510 nm Em	PSi-G0.05 Kisker

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (Dicke Nr. 1, 22x22 mm)

Erie Scientific Company (Portsmouth, NH, USA)

Dispenserspitzen, diverse Volumina

Ritter (Schwabmünchen, Deutschland)

Material und Methoden

Einmalreaktionsgefäße, diverse Volumina	Eppendorf (Hamburg, Deutschland) bzw. Greiner-Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Gewebekulturflaschen, für adhärenente Zellen	Greiner-Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Gewebekulturplatten, für adhärenente Zellen, 96 Kavitäten	Becton Dickinson/Falcon (Heidelberg, Deutschl.)
Kanülen: Microlance 3 (20 G1 1/2; 23 G1 1/4; 27 G3/4)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Nitrocellulosemembran: Hybond® ECL	GE Healthcare (München, Deutschland)
Objektträger: SuperFrost®	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Pasteurpipetten, Glas	Oehmen (Essen, Deutschland)
Pasteurpipetten, Kunststoff	Oehmen (Essen, Deutschland)
Petrischalen, diverse Durchmesser	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, diverse Volumina	Greiner-Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Röntgenfilm : Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare (München, Deutschland)
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm), diverse Größen	Pall Corporation (East Hills, NY, USA)
Skalpelle, diverse Formen	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen, diverse Volumina	Greiner-Bio One (Frickenhausen, Deutschland)

3.1.6 Geräte

Analysenwaage: R200D	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Brutschrank: Hera cell	Heraeus-Kendro (Langenselbold, Deutschland)
Dispenser: Multipette®	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Elektrophoresekammer: Mini-Protean II Cell	Bio-Rad (München, Deutschland)
Elektroblotter (semi-dry): Trans-Blot SD	Bio-Rad (München, Deutschland)
Elektroblotter (wet): Trans-Blot Cell	Bio-Rad (München, Deutschland)
Feinwaage: PT 210	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Filmentwickler: CURIX 60	AGFA (Köln, Deutschland)
Flachbettscanner: Scanjet G4050	Hewlett-Packard (Böblingen, Deutschland)

Material und Methoden

Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop: IX 70 mit Fluoview 2.0 und DP 50-CU CCD-Camera	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Kühlbrutschrank: Friocell 404	MMM Medcenter (München, Deutschland)
Lichtmikroskope: - CKX 41	Olympus (Hamburg, Deutschland)
- Axioplan 2 image mit Orca II CCD-camera	Zeiss (Göttingen, Deutschland) Hamamatsu (Herrsching, Deutschland)
- Stemi 2000 Stereomikroskop	Zeiss (Göttingen, Deutschland)
Netzteil: PowerPac 200 bzw. 300	Bio-Rad (München, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer, verbessert	Assistent (Sondheim, Deutschland)
pH-Meter: inoLab® pH 720	wtw (Weilheim, Deutschland)
Pipetten: - Pipetman® P	Gilson (Roissy-en-France, Frankreich)
- Reference®	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe: pipetus®	Hirschmann Laborg.(Eberstadt, Deutschland)
Schüttler: Shaker 3020	GFL® (Burgwedel, Deutschland)
Sonifikator: LABSONIC U	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterilbänke: - BSB 6A	Gelaire (Sydney, Australien)
- Herasafe KS 12	Heraeus-Kendro (Langenselbold, Deutschland)
Thermoblock: Techne dri-block DB 3	Intergra Bioscience (Fernwald, Deutschland)
Thermoschüttler: Thermomixer comfort mit diversen Thermoblöcken	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Wasserbad, temperierbar	GFL® (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifugen: - Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Pico	Thermo Fischer (Bonn, Deutschland)
- Megafuge 1.0	Heraeus-Kendro (Langenselbold, Deutschland)
- Multifuge 3 S-R	Heraeus-Kendro (Langenselbold, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Nematoden

Wurmstämme

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Wurmstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
N2	wt	CGC (Minneapolis, MN, USA)
wyls97	[P _{unc-86} ::myr-GFP; P _{unc-86} ::mCherry::RAB-3; P _{ord-1} ::GFP]	Prof. Kang Shen (Stanford, CA, USA)
RW1596	myo-3(st386);[myo-3::GFP;rol-6(su1006)]	CGC (Minneapolis, MN, USA)

Standardkulturbedingungen

Die Kultivierung der Nematoden wurde durch Brenner (Brenner 1974) beschrieben. Die Nematoden wurden bei 20 °C in einem Kühlbrutschrank auf NGM Agar-Platten gehalten, die mit *Echerichia coli* OP50 bewachsen waren. Bei den verwendeten 92 mm Platten wurden dafür jeweils 300 µl einer *Echerichia coli* OP50 Kultur ausgebracht und durch Schütteln verteilt. Für die Stammhaltung wurden entweder 12 –20 Adulte mittels eines Platin-Pickers oder ein Agar-Block auf eine frische NGM Agar-Platte überführt. Bei Kontaminationen mit Pilzen oder anderen Bakterien wurden die Würmer einer Bleichebehandlung unterzogen. Hierzu wurden die 92mm NGM Agar-Platten auf denen sich ausreichend viele gravide Hermaphroditen befanden zunächst mit 2 ml PBS versetzt. Die Platte wurde geschüttelt und etwas aufgestellt, damit sich die Hermaphroditen sammeln konnten. Diese wurden

anschließend in PBS in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (400x g; 2 min; RT). Der Überstand wurde verworfen und die Hermaphroditen im Pellet wurden mit 1 ml PBS versetzt. Zu diesem Ansatz wurden 0,5 ml Bleichelösung hinzugefügt. Während der nachfolgenden Inkubationszeit von 8 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Larven, die Hermaphroditen und die kontaminierenden Lebensformen abgetötet. Die Embryonen wurden durch die Eihülle geschützt. Die Embryonen wurden dann abzentrifugiert (400x g; 1 min; RT) und mit 1,5 ml PBS gewaschen. Etwa 20 – 40 µl der abzentrifugierten Embryonen in PBS wurden auf eine frische, *Echerichia coli* OP50 bewachsene NGM Agar-Platte ausgebracht.

Partikelbehandlung

Für die Partikelbehandlung der Nematoden wurden nicht angereicherte NGM Agar-Platten (NGM(-)) in den Durchmessern 60 bzw. 35 mm verwendet. Mittels eines Dispensers wurden üblicherweise 50 µl (bei Bedarf 150 µl) einer *Echerichia coli* OP50-Suspension aufgebracht. Das LB-Medium konnte über Nacht bei RT eintrocknen und die Bakterien anwachsen. Auf diese Platten wurden 50 µl einer 50 nm Silica-Nanopartikel Suspension (2,5 mg/ml) auf den Bakterien verteilt. Bei den Lebensspannen-Experimenten wurden 50 nm Silica-Nanopartikel Suspensionen in einer Konzentration von 0,25 mg/ml bis 5 mg/ml verwendet. Bei 150 µl *Echerichia coli* OP50-Suspension wurden 150 µl Partikelsuspension aufpipettiert. Die Silicapartikel in Suspension wurden von der Firma Kisker (Steinheim, Deutschland) bezogen. Bei den Kontrollgruppen wurde ein entsprechendes Volumen deionisiertes Wasser verwendet. Für die Behandlung wurden, sofern nicht anders angegeben, L4 Larven mittels eines Platin-Pickers auf die so vorbereiteten Platten überführt. Die Nematoden wurden je nach Bedarf täglich bzw. alle zwei Tage auf frische Platten überführt. Wo angegeben, enthielten die Agar-Platten Ethosuximid in der entsprechenden Konzentration.

3.2.2 Untersuchungen zur Lebensspanne

Die Untersuchung, wie sich die Silica-Nanopartikelbehandlung auf die Lebensspanne der Nematoden auswirkt, erfolgte bei 25 °C. Hierzu wurden junge adulte Hermaphroditen mittels eines Platin-Pickers auf entsprechend vorbereitete, mit *Echerichia coli* OP50 bewachsene 60 mm NGM Agar-Platten (NGM(-)) überführt. Jeden zweiten Tag wurden die Hermaphroditen auf frische Agar-Platten umgesetzt. Die Platten wurden täglich auf Vorkommen von toten Hermaphroditen überprüft. Hermaphroditen, die nicht auf leichte Berührung mit dem Platin-Picker reagierten, wurden als tote Nematoden gewertet. Hermaphroditen die den Agar verlassen haben (und ausgetrocknet sind) sowie Nematoden die einen bag-of-worms (BOW) Phänotyp zeigten wurden zensiert.

3.2.3 Untersuchungen zur Nachkommenproduktion und zum Eiablageverhalten

Um zu untersuchen wie sich die Partikelbehandlung auf die Nachkommenproduktion auswirkt, wurden Hermaphroditen auf den entsprechenden Platten kultiviert und die Anzahl der abgelegten Eier bzw. Nachkommen protokolliert. Hierzu wurden am Anfang des Experiments auf jede 60 mm NGM Agar-Platte (NGM(-)) drei L4 Larven mittels eines Platin-Pickers überführt. Die sich daraus entwickelnden Hermaphroditen wurden täglich über sieben Tage auf frische Platten überführt. Die auf den benutzten Platten verbleibenden Eier und Larven wurden unter einem Stereomikroskop gezählt. An dem der Auszählung nachfolgenden Tag wurde die auf den Platten verbliebene Anzahl nicht geschlüpfter Eier ermittelt. Um die tägliche Anzahl der Nachkommen pro Hermaphrodit zu erhalten, wurde die gezählte Anzahl der Nachkommen durch die Zahl der auf die Platte aufgebrachten Hermaphroditen geteilt. Bei diesem Experimentaufbau konnten auch eventuell auftretende Phänotypen aufgezeichnet werden.

Zwei Methoden, die geeignet sind die Funktionalität des Eiablageapparates zu untersuchen, wurden von Koelle und Horvitz (Koelle und Horvitz 1996) beschrieben.

Bei der ersten Methode wird die Anzahl der im Uterus verbleibenden Eier ermittelt. Hierzu wurden die verschieden behandelten adulten Hermaphroditen an definierten Zeitabschnitten nach dem L4 Larvenstadium untersucht. Je Kavität einer 96-Kavitäten-Platte mit Flachboden wurden 100 µl einer 1,2%igen Natriumhypochloritlösung mittels eines Dispensers pipettiert. Mit einem Platin-Picker wurde je Kavität ein adulter Hermaphrodit überführt. In der Bleichelösung wurden die Tiere zersetzt, die Eier blieben aufgrund ihrer Eihülle jedoch intakt. Die Anzahl der Eier wurde unter einem Stereomikroskop ermittelt.

Bei der zweiten Methode wird das Entwicklungsstadium der kürzlich abgelegten Eier untersucht, um Rückschlüsse auf die Verweildauer der Embryonen im Uterus nach der Befruchtung zu ziehen. Experimentell wurden hierbei 50 gravide Hermaphroditen auf eine frische NGM Agar-Platte überführt. Nach 30 Minuten wurden die Hermaphroditen entfernt. Mit einem Stück Klebeband (Tesa® -film, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) wurde der gesamte Bakterienrasen mitsamt der sich darin befindlichen Eier auf einen Objektträger überführt und fixiert. Das Entwicklungsstadium wurde lichtmikroskopisch ausgewertet.

3.2.4 Herstellung von mikroskopischen Präparaten

Für mikroskopische Untersuchungen wurden Agarosepad-Präparate verwendet. Es wurden zwei Objektträger mittels Klebeband auf dem Labortisch fixiert. Der Abstand der beiden Objektträger wurde so gewählt, dass zwischen ihnen ein dritter Objektträger passte. Auf diesen Objektträger wurde mittels einer Kunststoff-Pasteurpipette ein Tropfen warme, 3%ige Agaroselösung aufgebracht und sofort mit einem vierten Objektträger, möglichst ohne Luftbläschen verpresst. Das Klebeband diente hierbei als Abstandshalter. Das nach dem Erkalten der Agaroselösung entstandene Agarosepad wurde quadratisch zugeschnitten. Darauf wurden 25 µl

einer 5 mM Natriumazidlösung in M9-Puffer pipettiert. Das Natriumazid diente als Anästhetikum. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter einem Stereomikroskop durchgeführt. In den Tropfen wurden mittels eines Platin-Pickers die zu untersuchenden Tiere überführt. Es wurde ein Deckglas, dessen Ränder vorher mit Vaseline bestrichen worden waren, aufgelegt. Dabei wurden Lufteinschlüsse vermieden. Das Deckglas wurde vorsichtig aufgedrückt, bis es auf den Tieren auflag. Die so hergestellten Präparate wurden in aufrechten und inversen Lichtmikroskopen verwendet.

3.2.5 Mikroskopie, Bildverarbeitung und Auswertung

Die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Silica-Nanopartikeln wurde mittels eines Zeiss Axioplan 2 image (Zeiss, Göttingen, Deutschland) aufrechten Lichtmikroskops mit 25x/0.80 Plan-NEOFLUAR oder 63x/1.4 Plan-APOCHROMAT Objektiv untersucht. Für die Analyse der Lipofuscin-Akkumulation wurde ein 10x/0.30 Plan-NEOFLUAR Objektiv verwendet. Die digitalen Bilder wurden mittels einer HAMAMATSU Orca II CCD-Camera (Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) über die Software Openlab 5.5.0 (Improvision, Tübingen, Deutschland) erstellt. Für Fluoreszenzbilder wurden die folgenden Zeiss Filtermodule verwendet: Filtersatz 10 (Anregung 450-490 nm, Emission 515-565 nm), Filtersatz 15 (Anregung 546 nm, Emission 590 nm), Filtersatz 02 (Anregung G 365, Emission LP 420). Für die quantitative Auswertung der Lipofuscin-Akkumulation wurden Analysebereiche (engl. regions of interest: ROI) um die Lipofuscin-Fluoreszenz im Darm der Hermaphroditen festgelegt. Die mittlere Fluoreszenzintensität in den ROI wurde mit der Software Metamorph® 4.3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) bestimmt. Die Daten wurden in Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) ausgewertet. Die Bildbearbeitung erfolgte in Photoshop® 7.0 (Adobe, München, Deutschland).

Die morphologischen Untersuchungen an HSN und den Vulvamuskeln erfolgten an einem inversen Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70 (Olympus,

Hamburg, Deutschland) mit 40x/0,85 UplanApo, 60x/1,25 UplanFL oder 60x/1,42 PlanApo N Objektiv. Die Morphologie der Vulvamuskeln wurde in einer Experimentreihe mittels einer Olympus DP 50-CU CCD-Camera angesteuert über die Software analySIS® 3.0 digital aufgezeichnet. Für Fluoreszenzaufnahmen wurde ein Olympus U-MNIBA Filtermodul (Anregung 470-490 nm, Emission 515-590 nm) verwendet. Die mikroskopische Analyse von GFP- bzw. mCherry-Signalen wurde teilweise auch mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Olympus Fluoview 2.0 am IX 70 (Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zur Anregung der Fluorophore diente ein Krypton-Argon-Laser. Das Emissionsspektrum dieses Lasers umfasst den Wellenlängenbereich zwischen 457 und 676 nm mit Leistungsspitzen bei 488, 568 sowie 647 nm. Zur Anregung von GFP (Grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*) (Shimomura et al. 1962) wurde ein Filter mit hoher Transmission bei 488 nm vorgeschaltet. mCherry (Rot fluoreszierendes Protein) wurde bei 568 nm angeregt. Für die Untersuchung der HSN und der Vulvamuskulatur wurden optische Z-Schnitt-Abbildungen erzeugt, die je nach morphologischen Gewebe eine Höhe von 10-25 µm hatten. Für die Erzeugung von Z-Schnitt Projektionen und für quantitative Analysen wurde die Analysesoftware Metamorph® 4.3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) eingesetzt. Die erzeugten digitalen Bilder wurden mit Photoshop®7.0 (Adobe, München, Deutschland) für Abbildungen aufbereitet.

3.2.6 Zellkultur

SK-N-SH –Zellen (*human neuroblastoma cell line*) wurden in Zellkulturmedium in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für zwei bis drei Tage kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, wenn 60 – 70 % Konfluenz (subkonfluentes Stadium) erreicht war. Bei Verwendung von 75 cm²-Gewebekulturflaschen wurden 1x10⁶ SK-N-SH -Zellen in 25 ml frischem Vollmedium ausgesät.

Für mikroskopische Anwendungen, wurden die Zellen bei gleichen Kulturbedingungen auf Deckgläschen kultiviert. Hierfür wurden 5x10⁴ Zellen je

sterilisiertes Deckglas ausgesät. Zur Sterilisierung wurden die Deckgläschen in absoluten Ethanol getaucht und kurz durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen. Subkonfluenz war auch hier nach zwei Tagen erreicht. Um eine Mykoplasmeninfektion auszuschließen, wurde in regelmäßigen Zeitabständen eine DNA-Färbung mittels DAPI durchgeführt und auf cytoplasmatisch lokalisierte DNA untersucht.

3.2.7 Partikelfällungsexperimente

Um die Interaktionen von Silica-Partikeln mit Proteinen zu untersuchen, wurden Partikelfällungsexperimente durchgeführt. Analog zu Immunpräzipitationsexperimenten, in denen Proteinkomplexe mittels Antikörpern und daran bindenden Sepharose-Beads präzipitiert werden, dienten hier die Partikel selbst als das Werkzeug zum Präzipitieren. Aufgrund ihrer Dichte von 2 g/cm^3 konnten sowohl die hierbei eingesetzten 500nm Silica-Partikel als auch die 50 nm Silica-Nanopartikel durch Zentrifugation präzipitiert werden. Eine mögliche Interaktion der Partikel mit zellulären Proteinen wurde untersucht, indem die Partikel in Lysaten von Zellen bzw. Nematoden inkubiert wurden. Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert. Die DNA wurde durch jeweils 10-faches aufziehen und herausdrücken in eine Spritze durch Kanülen abnehmenden Durchmessers gescheert. Um nicht lysierte Zellfragmente zu entfernen, wurde das Lysat in einem 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert ($20800 \times g$; 15 min ; $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Von diesem Lysat wurde ein Teil abgenommen und für die „Input“-Probe verwahrt. In einem neuen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 900 μl geklärtes Zelllysate mit 100 μl Silica-Partikelsuspension (25 mg/ml bei 50 nm Silica-Nanopartikeln; 50 mg/ml bei 500 nm Silica-Partikeln) für 16 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ unter invertieren inkubiert. Anschließend wurden die Partikel samt der daran gebundenen Proteine präzipitiert ($20800 \times g$; 15 min ; $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Der Überstand wurde abgenommen und verwahrt. Die Partikel-Protein-Komplexe wurden zwei mal in 500 μl RIPA-Puffer resuspendiert und gewaschen (Zentrifugation $20800 \times g$; 5 min ; $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Die „Input“-Probe, der Überstand und die Partikel-Probe wurde mit 2X SDS Gel-Ladepuffer versetzt. Die Proteine wurden durch Hitze denaturiert ($95 \text{ }^\circ\text{C}$; 5 min)

und nachfolgend elektrophoretisch aufgetrennt. In einer Experimentreihe wurde statt eines Zelllysats rekombinant exprimierte Topoisomerase I (# T9069; Sigma, St. Louis, MO, USA) verwendet. Lysate von Nematoden wurden mit Lysepuffer hergestellt. Der Lysepuffer wird auch für Immunpräzipitationsexperimente in *C. elegans* verwendet (Patel und Shen 2009). Die Nematoden wurden mit PBS gewaschen und in Lysepuffer sonifiziert. Das Nematodenlysate wurde durch zentrifugieren (20800x g ; 15 min ; 4 °C) geklärt. Nachfolgend wurde analog nach dem für Zelllysate beschriebenen Protokoll vorgegangen.

3.2.8 SDS-PAGE und Western Blot

Die Proben aus den Partikelfällungsexperimenten wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Es kam ein denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel in einer Mini-Protean III-Apparatur (Bio-Rad, München, Deutschland) zum Einsatz. Abhängig von der Proteingröße wurden Trenngele mit 7% bzw. 12% Acrylamid verwendet. Die Proteine wurden bei einer angelegten Spannung von 180 V aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden nachfolgend in zwei Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert: einerseits im „semidry“-Verfahren innerhalb von 45 Minuten in einer Elektroblo-Apparatur bei einer Spannung von 15 V; andererseits, insbesondere für Proteine über 100 kDa, im „Wet-Blot“-Verfahren innerhalb einer Stunde in einer von außen mit Eis gekühlten Wet-Blot-Apparatur bei einer Spannung von 100 V. Zur Überprüfung der Proteinübertragung wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S gefärbt. Nach der Entfärbung mit destilliertem Wasser wurde die Nitrocellulosemembran getrocknet und bei -20 °C eingelagert. Ferner wurden die im Polyacrylamid-Gel verbliebenen Proteine mit dem Farbstoff Brillant-Blau angefärbt. In dem Färbeverfahren nach Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989) wurden die SDS-Polyacrylamidgele mit der Coomassie-Färbelösung für mindestens 4 Stunden bei RT gefärbt und anschließend für 4-8 Stunden mit der Entfärbelösung entfärbt, bis die Hintergrundfärbung ausgewaschen war und nur noch distinkte Proteinbanden zu sehen waren. Für die Dokumentation wurde das entfärbte Polyacrylamid-Gel mit einem Flachbettscanner digital aufgezeichnet.

3.2.9 Immundetektion

Um die an der Nitrocellulosemembran adsorbierten Proteine mittels spezifischen Antikörpern detektieren zu können, mussten die noch unbesetzten proteinaffinen Bereiche der Membran abgesättigt werden. Dies wurde durch eine einstündige Inkubation der Nitrocellulosemembran in Proteinblockpuffer erreicht. Im Anschluss wurde die Membran bei Raumtemperatur 60 Minuten mit primärem Antikörper inkubiert, der seinem Titer entsprechend in Proteinblockpuffer verdünnt worden war. Die ungebundenen Antikörper wurden innerhalb von drei Waschschritten von je 10 Minuten Dauer in PBS-Tween entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgte analog, jedoch nur 45 Minuten. Danach wurde wieder dreimal 10 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Die Membran wurde dann in eine in einer Filmkassette befindliche, kleine Tasche aus transparenter Kunststoffolie überführt und nach Herstellerangaben mit der ECL-Reagenz äquillibriert. Das bei der Chemilumineszenzreaktion emittierte Signal wurde mit Röntgenfilmen aufgezeichnet. Die Expositionszeiten der Röntgenfilme betragen zwischen weniger als einer Minute und bis zu einer Stunde. Die Röntgenfilme wurden automatisiert in der Entwicklermaschine CURIX 60 (AGFA, Köln, Deutschland) entwickelt.

3.2.10 Statistik

Statistische Analysen erfolgten in Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland). Die entsprechenden Datensätze wurden mittels ungepaarten zweiseitigen t-Test verglichen. Bei angenommener Normalverteilung der Daten wurde die Wahrscheinlichkeit (p) berechnet, dass es sich bei der Differenz um einen zufälligen Unterschied handelt. Bei einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde ein signifikanter Unterschied angenommen. Wo angegeben wurden die

Datensätze mittels SPSS (SPSS Software GmbH, München, Deutschland) mit Ein-Weg Varianzanalyse (ANOVA) und Tukeys-Post-hoc-Test auf signifikante Unterschiede überprüft.

Die Auswertung der Lebensspanne erfolgte mit der Software SPSS (SPSS Software GmbH, München, Deutschland) nach der Kaplan-Meier Methode. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Log-Rank Test ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Interaktionen von Silica-Partikeln *in vitro*

Um zu untersuchen, ob Silica-Partikel mit zellulären Proteinen interagieren, wurden Fällungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden Silica-Partikel mit SK-N-SH Zelllysaten oder einem Lysat von rekombinant hergestellter, gereinigter Topoisomerase I (Topo I) in RIPA Puffer 16 Stunden inkubiert. Das Vorkommen von Topoisomerase I in den drei Fraktionen der Experimente wurde mittels Immunoblot untersucht. Bei den Experimenten wurden Silica-Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 500 nm und 50 nm Silica-Nanopartikel verwendet. Proteine aus dem eingesetzten Gesamtlysate (In) die während der Partikelinkubation an die Partikel adsorbiert wurden, konnten aufgrund der Dichte der Silica-Partikel durch Zentrifugation im Pellet (P) sedimentiert werden. Die Konzentration dieser Proteine im Inkubationsvolumen, also dem Überstand (Üb) nahm folglich ab. Abbildung 4.1 zeigt das Resultat der Immundetektion des Proteins Topoisomerase I in den Experimentfraktionen. Die Intensität der spezifischen Proteinbande nimmt in den Überstand-Fraktionen der vier Experimentansätze im Vergleich zu den Gesamtlysaten ab. Gleichzeitig ist Topoisomerase I eindeutig in der Sediment-Fraktion detektierbar. Bei den Proben mit der rekombinant hergestellten Topoisomerase I ist die spezifische Bande in den Überstand-Fraktionen nicht detektierbar.

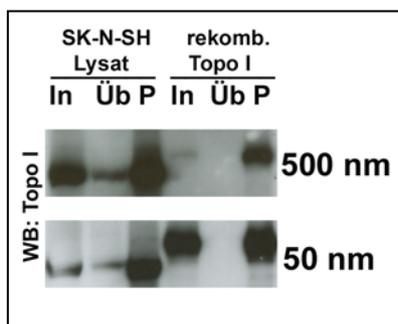


Abbildung 4.1 Silica-Partikel komplexieren mit Topoisomerase I

Feine und nanoskalige Silica-Partikel wurden 16 Stunden mit SK-N-SH Zelllysate oder rekombinanten Proteinlysate inkubiert. Partikel-Protein-Komplexe wurden pelletiert. Der Proteingehalt von Topoisomerase I im Pellet (P), im Überstand (Üb) sowie dem eingesetzten Lysate (In) wurde mittels Immunoblot untersucht. Die Silica-Partikel adsorbieren Topoisomerase I auch in rekombinanten Proteinlysate.

Um den zeitlichen Verlauf der Adsorption von zellulären Proteinen an die Silica-Partikel zu studieren, wurden die Partikelinkubationszeiten in den Partikelfällungsexperimenten variiert. In der Abbildung 4.2 sind die Resultate dieser Experimente dargestellt. In Partikelfällungsexperimenten mit feinen Silica-Partikeln (Abb. 4.2, A) treten spezifische Topoisomerase I Banden in den Pellet-Fractionen bereits nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten auf. Im Verlauf der Inkubationszeiten über 1, 4, 8 bis 16 Stunden zeigt sich kein verändertes Verhältnis der Bandenintensität in den Pellet-Fractionen im Vergleich zum Überstand. Bei Inkubationen von Zelllysate mit Silica-Nanopartikeln wird Topoisomerase I nach 5 min in gleichem Maße gefällt wie nach 16 h (Abb. 4.2, B).

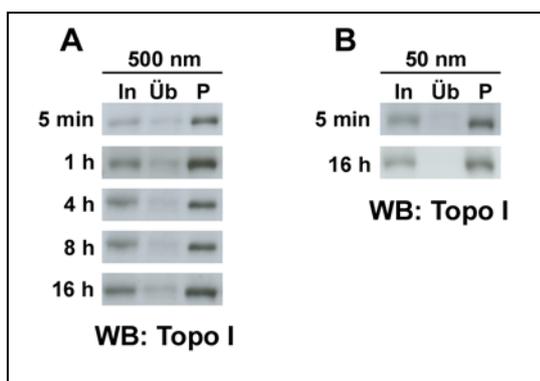


Abbildung 4.2 Silica-Partikel komplexieren mit Topoisomerase I bereits nach 5 Minuten

Zelllysate wurde für unterschiedliche Zeitspannen mit feinen oder nanoskaligen Silica-Partikeln inkubiert. Das Vorkommen von Topoisomerase I in den Experiment-fractionen wurde im Immunoblot untersucht. **A** Feine (500 nm) Silica-Partikel wurden für Zeiträume zwischen 5 Minuten und 16 Stunden mit SK-N-HS Lysat inkubiert. Topoisomerase I konnte bereits nach 5 Minuten Inkubationszeit aus dem Lysat gefällt werden, was an der reduzierten Bandenintensität von Topoisomerase I im Überstand (Üb) im Vergleich zum Gesamtzelllysate (In) erkennbar ist. **B** Für 5 Minuten oder 16 h wurden Silica-Nanopartikel (50 nm) mit Zelllysate inkubiert. Unabhängig von der Inkubationsdauer ist Topoisomerase I im Pellet (P) nachweisbar.

Inwiefern sich die in den Partikelfällungen eingesetzte Silica-Partikelkonzentration auf die Kinetik der Komplexbildung auswirkt, zeigen Experimente in denen Zelllysate mit feinen und nanoskaligen Silica-Partikeln in Konzentrationen von 2,5 ; 0,5 oder 0,05 mg/ml inkubiert wurden (Abb. 4.3). Bei Einsatz von Silica-Nanopartikeln ist eine Reduktion der Topoisomerase I Bande in der Pellet-Probe insbesondere beim Konzentrationssprung von 0,5 mg/ml auf 0,05 mg/ml zu beobachten. Gleichzeitig nimmt hierbei die Topoisomerase I Bandenintensität in der Überstand-Fraktion zu. Ähnlich verhält sich die Protein-Partikel-Komplexbildung durch variieren der Konzentration von feinen Silica-Partikeln (500 nm). Hierbei ist die Zunahme der

Topoisomerase I Bandenintensität in der Überstand-Fraktion bei sinkender Silica-Partikelkonzentration erkennbar. Zusätzlich ist Topoisomerase I in der Pellet-Fraktion der 0,05 mg/ml Probe nicht detektierbar.

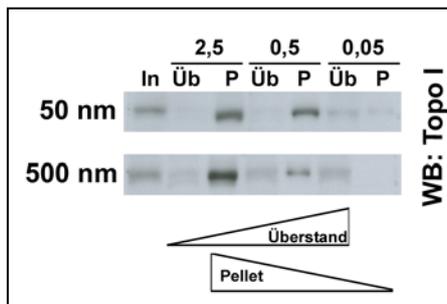


Abbildung 4.3 Bildung von Partikel-Protein-Komplexen in Abhängigkeit zur Konzentration der Silica-Partikel.

Silica-Partikel mit Durchmessern von 500 nm und 50 nm wurden in Konzentrationen von 2,5 ; 0,5 und 0,05 mg/ml mit Zellysat inkubiert. Das Vorkommen von Topoisomerase I in den Experimentfraktionen wurde mittels Immunoblot untersucht. Der Anteil von Topoisomerase I im Pellet (P) nimmt mit abnehmender Partikelkonzentration ab während der Anteil im Überstand (Üb) zunimmt.

Die Untersuchung, ob es sich um eine unspezifische Adsorption von Proteinen an die Silica-Partikeloberfläche handelt oder dass bestimmte Proteine eine hohe Affinität für Silica-Partikel aufweisen und andere nicht, erlaubt Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Proteincorona im Zellysat. Zu diesem Zweck wurde das Vorkommen von ausgewählten Proteinen in den jeweiligen Experimentfraktionen der Partikelfällungsexperimente mittels Immunoblot untersucht (Abb. 4.4). Während nucleoplasmatische Proteine wie Topoisomerase I, das nucleäre Mitoseapparat-Protein (engl. nuclear mitotic apparatus; NuMA), das Kernhüllenprotein Lamin-B-Rezeptor (LBR) oder das nucleoläre Protein Fibrillarin in der Proteincorona von feinen und nanoskaligen Silica-Partikeln vorkommen (Abb.4.4, A), zeigen andere Proteine ein differenziertes Ergebnis. Das transkriptionsrelevante TATAbox-bindende Protein (TBP), das mit der Huntington'schen Krankheit assoziierte Protein Huntingtin oder das heterochromatische Protein HP1 γ werden durch feine Silica-Partikel nur in geringen bzw. nicht detektierbaren Anteilen präzipitiert, sie verbleiben größtenteils im Überstand. Bei Einsatz von 50 nm Silica-Nanopartikeln kommen TBP, Huntingtin ausschließlich und HP1 γ zu einem erheblichen Maß in der Pellet-Fraktion und nicht bzw. reduziert in der Überstand-Fraktion vor. Die α - Untereinheiten 1,2,3,5,6&7 des 20 S Proteasoms (20S Prot.) und das replikationsrelevante Protein PCNA (engl. proliferating cell nuclear antigen) werden sowohl von feinen Silica-Partikeln als auch Silica-Nanopartikeln nur in geringen Anteilen präzipitiert bzw. sind in den jeweiligen

Pellet-Fractionen nicht detektierbar. Die Bandenintensität in den Überstand-Fractionen entspricht annähernd der Bandenintensität in den eingesetzten Gesamtlösungen (In), was bestätigt, dass der Überwiegende Anteil der Proteine nicht gefällt wurde.

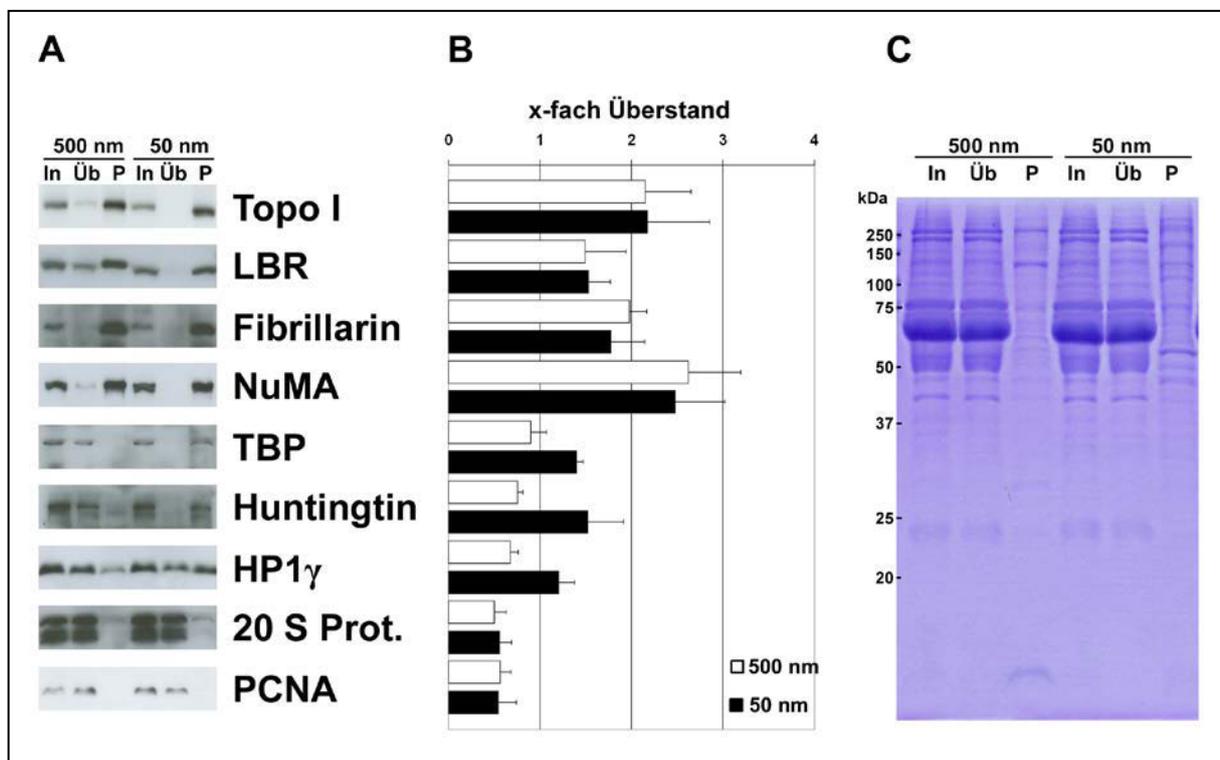


Abbildung 4.4 Abhängigkeit der Zusammensetzung der Proteincorona von der Größe der Silica-Partikel

Das Vorkommen ausgewählter zellulärer Proteine in den Partikel-Protein-Komplexen wurde mittels Immunoblot untersucht. **A** Gezeigt sind Resultate aus Partikelfällungsexperimenten mit feinen (500 nm) und nanoskaligen (50 nm) Silica-Partikeln. Das Vorkommen einer Proteinbande im Pellet (P) bei gleichzeitiger Abnahme der Bandenintensität im Überstand (U) deutet auf eine starke Protein-Partikel-Wechselwirkung hin. **B** Quantitative Auswertung der spezifischen Bandensignalintensität in der Pellet Probe (P) im Verhältnis zum Überstand (Ü). Es können drei Proteingruppen unterschieden werden. (1.) Proteine mit starker Wechselwirkung ($P / \text{Üb} > 1$) mit 500 nm und 50 nm Silica-Partikeln. (2.) Proteine mit starker Wechselwirkung mit 50 nm Silica-Nanopartikeln. (3.) Proteine mit schwacher Wechselwirkung ($P / \text{Üb} < 1$) mit 500 nm und 50 nm Silica-Partikeln. **C** Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel zeigt distinktes Bandenmuster in den Pellet-Fractionen.

Als Maß für die Partikel-Protein-Wechselwirkung wurde der Quotient aus der Bandensignalintensität in der Pellet-Fraktion durch die Bandensignalintensität in der Überstand-Fraktion in Metamorph® 4.3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) quantifiziert (Abb. 4.4, B). Bei einem Wert des x-fachen Überstand größer als 1 kann eine hohe Affinität eines Proteins zu den feinen (weiße Balken) bzw. nanoskaligen (schwarze Balken) Silica-Partikeln angenommen werden. Eine niedrige Affinität der Proteine zu den Partikeln ist bei einem Wert kleiner 1 gegeben. Für die Zusammensetzung der Proteincorona der 500 nm Silica-Partikel können aus den Resultaten die folgenden Proteine als Bestandteil angenommen werden: Topo I, LBR, Fibrillarin und NuMA. Die Proteincorona der 50 nm Silica-Nanopartikel enthält zusätzlich zu den o. g. Proteinen noch TBP, Huntingtin und HP1 γ . Hingegen sind die α - Untereinheiten 1,2,3,5,6&7 des 20 S Proteasoms und PCNA unter den gewählten Bedingungen nicht oder nur zu einem geringen Maß als Konstituenten der Proteincorona von Silica-Partikeln anzunehmen, da der Quotient P/Üb bei 500 nm und 50 nm Silicapartikeln kleiner als 1 ist. Das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zeigt distinkte Banden in den Pellet-Fraktionen (Abb. 4.4, C). Das Bandenmuster in den Pellet-Fraktionen stimmt nicht mit dem Banden-Muster im Gesamtlysate (In) oder Überstand (Üb) überein. Distinkte Banden in der Pellet-Fraktion der 50 nm Silica-Nanopartikel sind nicht in der Pellet-Fraktion der feinen Silica-Partikel wiederzufinden. Das Bandenmuster der beiden Pellet-Fraktionen unterscheidet sich.

Um zu untersuchen, ob Silicapartikel außer mit zellulären Proteinen aus SK-N-SH Zelllysate auch mit *C. elegans* Proteinen interagieren, wurden Partikelfällungsexperimente mit Lysate von *C. elegans* Nematoden durchgeführt. In dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel sind in den Pellet-Fraktionen der SK-N-SH- und der *C. elegans* -Proben distinkte Proteinbanden bei etwa 250 kDa (SK-N-SH- und *C. elegans*) und bei etwa 40 kDa (*C. elegans*) erkennbar (Abb. 4.5, A). Gleichzeitig zeigt sich, dass die korrespondierenden Banden, die in den Gesamtlysate-Fraktionen (In) auftreten, in den Überstand-Fraktionen nicht mehr erkennbar sind. Da die Sensitivität der Coomassie-Färbung begrenzt ist, wurden die Ergebnisse durch

Immundetektionen der Nitrocellulosemembranen ergänzt (Abb. 4.5, B). Hierbei wurden Antikörper gegen die α - Untereinheiten 1,2,3,5,6&7 des 20 S Proteasoms und das snRNP-Protein (engl. small nuclear ribonucleoprotein-particle) U1-70k verwendet (Abb. 4.5, B). Die Antikörper detektieren die 20 S α - Untereinheiten 1,2,3,5,6&7 in den Gesamtlysate- (In) und Überstand-Fractionen (Üb) der Lysate von SK-N-SH Zellen und *C. elegans* Nematoden. U1-70k wird in den Gesamtlysate- und den Pellet-Fractionen (P) der beiden Lysate detektiert.

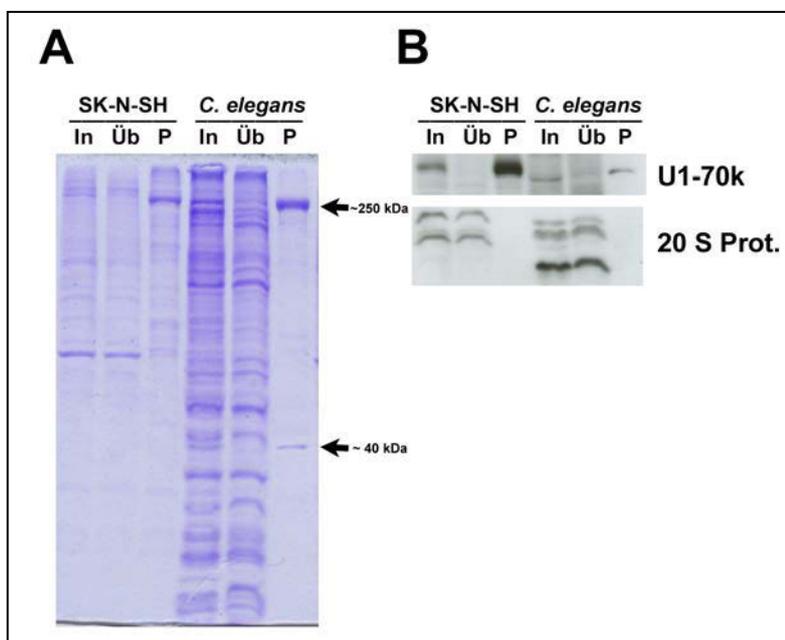


Abbildung 4.5 Silica-Partikel präzipitieren Proteine aus Lysat von *C. elegans*

SK-N-SH Zellen oder *C. elegans* Nematoden wurden in Lysepuffer lysiert und mit Silica-Partikeln inkubiert. **A** Coomassiefärbung des Polyacrylamid-Gels zeigt deutliche Proteinbanden (Pfeile) in der Pellet-Probe (P) von Zellysate und Lysate von *C. elegans*. **B** Immunoblot zeigt das Vorkommen ausgewählter zellulärer Proteine in Gesamtlysate (In), Überstand (Üb) und Pellet (P).

4.2 Aufnahme von Silica-Nanopartikeln durch *Caenorhabditis elegans*

Ausgehend von den *in vitro* Experimenten, sollten nachfolgend mögliche Effekte von Silica-Nanopartikeln auf den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans in vivo* untersucht werden. Zunächst war zu klären, ob und wie Silica-Nanopartikel durch die Nematoden aufgenommen werden. Um diese Frage experimentell zu beantworten, konnten fluoreszenzmarkierte Silica-Nanopartikel verwendet werden. Weil *C. elegans* transparent ist, wurde die Aufnahme der fluoreszierenden Silica-Nanopartikel in die Hermaphroditen mittels eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Hierzu wurden junge adulte Hermaphroditen auf NGM Agar-Platten überführt, die mit

OP 50 *E. coli* –Bakterien als Futter und TRITC-gekoppelten Silica-Nanopartikeln präpariert worden waren. Nach einer Behandlungsdauer von 16 Stunden wurden Agarosepräparate hergestellt. Die Aufnahme der markierten Silica-Nanopartikel in die Hermaphroditen wurde untersucht (Abb. 4.6). Die invertierten Fluoreszenzmikrographien zeigen deutliche Fluoreszenzsignale, die anhand der korrespondierenden Normarskiopik-Aufnahmen im Lumen des Pharynx (im terminalen Bulbus) und des Darms lokalisiert werden können (Abb. 4.6, A). Das Schema zeigt die Anatomie eines Hermaphroditen (Abb. 4.6, B).

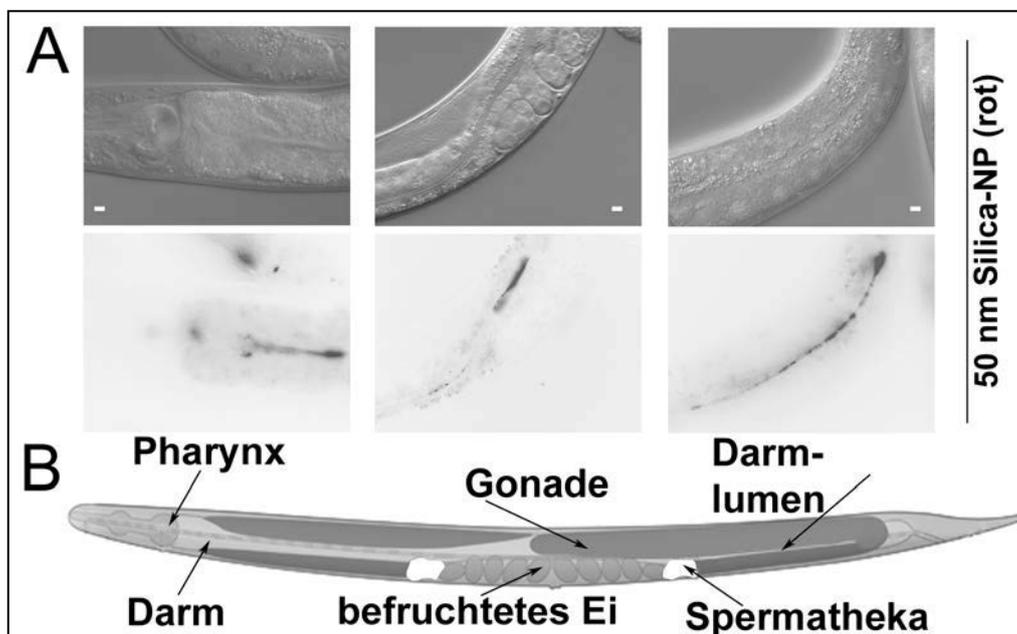


Abbildung 4.6 Aufnahme von Silica-Nanopartikeln durch *Caenorhabditis elegans*

C. elegans Hermaphroditen wurden für 16 h mit fluoreszenzmarkierten Silica-Nanopartikeln behandelt. Die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Silica-Nanopartikel wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **A** Dargestellt sind invertierte Fluoreszenzmikrographien mit korrespondierenden Aufnahmen des differentiellen Interferenzkontrast. **B** Schema der Anatomie eines *C. elegans* Hermaphroditen. Größenbalken: 10 μm

4.3 Die Lebensspanne nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln

Ob die Aufnahme von Silica-Nanopartikeln sich auf die Lebensspanne der Hermaphroditen auswirkt, wurde experimentell überprüft. Hierzu wurden junge adulte Hermaphroditen auf die, wie angegeben präparierten, mit *E. coli* – bewachsenen NGM Agar-Platten überführt. Das Überleben der Hermaphroditen wurde täglich überprüft. Die Überlebenskurve zeigt keine Unterschiede im Verlauf zwischen unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen (Abb. 4.7). Die statistische Auswertung mit dem Log-Rank-Test ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

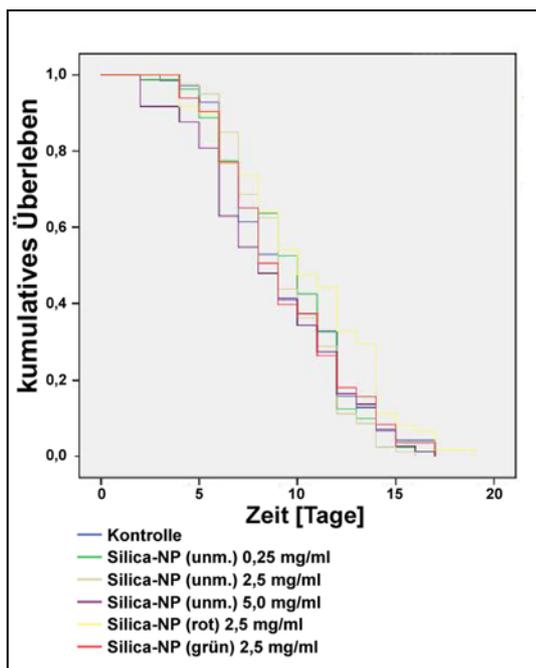


Abbildung 4.7 Kaplan-Meier Überlebenskurve von unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen

Hermaphroditen wurden bei 25°C auf *E. coli* – bewachsenen NGM Agar-Platten gehalten, die wie angegeben präpariert waren. Die Gruppen zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf. Die Analyse der Lebensspannen mittels Log-Rank-Test ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen. Drei unabhängige Experimente ($n \geq 61$)

4.4 Akkumulation von Lipofuscin nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln

Inwiefern sich die Behandlung mit Silica-Nanopartikeln auf die Akkumulation von Lipofuscin auswirkt, wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Lipofuscin-Fluoreszenzsignale wurden digital aufgezeichnet. Wie in den Fluoreszenz-Mikrographien erkennbar, akkumuliert Lipofuscin mit zunehmenden Alter der Hermaphroditen im Darm (Abb. 4.8, A). Die quantitative Auswertung der Akkumulation von Lipofuscin in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen ergibt am vierten Tag (Abb. 4.8, B) und am zehnten Tag nach dem L4 Stadium (Abb. 4.8, C) keine signifikanten Unterschiede.

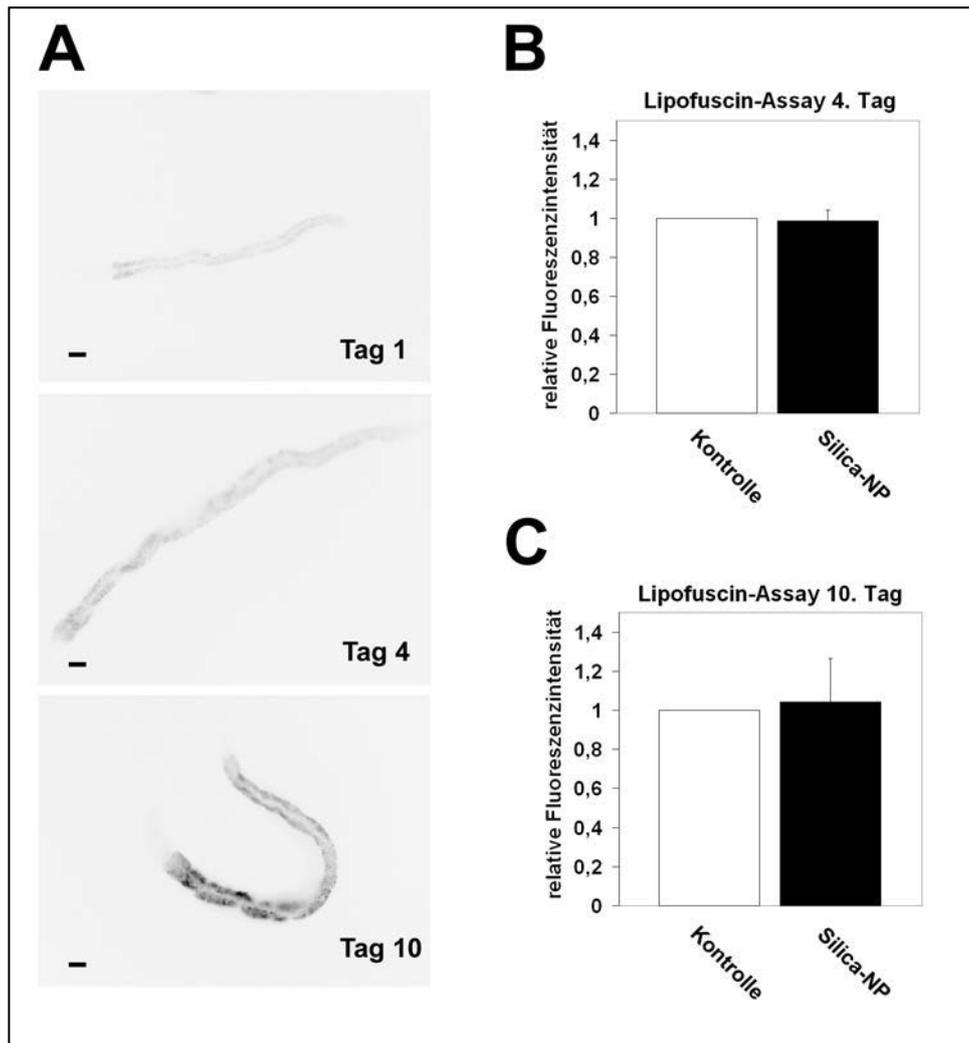


Abbildung 4.8 Akkumulation von Lipofuscin in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen

C. elegans L4 Larven wurden auf *E. coli* – bewachsene, wie angegeben präparierte NGM Agar-Platten überführt. Die sich daraus entwickelnden Hermaphroditen wurden alle zwei Tage auf frische NGM Agar-Platten umgesetzt. An den beschriebenen Zeitpunkten wurden Agarose-Präparate hergestellt und die Lipofuscin-Akkumulation fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **A** Repräsentative Mikrographien zeigen die altersabhängige Zunahme der Lipofuscin-Autofluoreszenz im Darm von unbehandelten Hermaphroditen. **B, C** Quantitative Auswertung der Lipofuscin-Fluoreszenz von unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen nach 4 oder 10 Tagen. Mittelwerte(+Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten (n= 47, B; n=30, C). Größenbalken: 50 μ m

4.5 Effekt auf Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit

4.5.1 Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit bei Behandlung ab L4

Ein weiterer Parameter der bei der Erforschung der Effekte von exogenen Noxen auf *C. elegans* Nematoden analysiert wird, ist die Nachkommenproduktion. Um die Reproduktion von unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen zu untersuchen, wurden L4 Larven auf entsprechend vorbereitete NGM Agarplatten überführt. Innerhalb eines Zeitraums von sieben Tagen wurden die sich daraus entwickelnden Nematoden täglich auf frische Platten umgesetzt. Die Anzahl der auf den Platten verbleibenden Nachkommenschaft wurde dokumentiert. Die Nachkommen konnten sich über mindestens 24 Stunden weiterentwickeln, um auf Entwicklungsdefekte, wie beispielsweise larvalen Arrest zu testen. In der Kontrolle und in den Silica-Nanopartikel behandelten Gruppen entwickelten sich die Nachkommen bis zum Schlupf und darüber hinaus bis zu fertilen Adulten (Beobachtung nicht gezeigt). Innerhalb des Zeitraums von 7 Tagen nach dem L4 Stadium produzieren die unbehandelten Hermaphroditen im Durchschnitt 217 ± 29 Nachkommen (Abb. 4.9, A). Die Zahl der Nachkommen ist bei den Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen signifikant reduziert: TRITC-gekoppelte 50 nm Silica-NP (rot) 173 ± 24 ; FITC-gekoppelte 50 nm Silica-NP (grün) 172 ± 29 ; 50 nm Silica-NP(unm.) 177 ± 31 . Der Zeitverlauf der täglichen Nachkommenproduktion (Abb. 4.9, B) zeigt, dass das Maximum der Nachkommenproduktion an Tag 3 post L4-Stadium erreicht ist. Insbesondere hier produzieren einzelne Silica-Nanopartikel behandelte Hermaphroditen mit etwa 50 Eiern deutlich weniger als unbehandelte Hermaphroditen (71 ± 8). Bei den Experimenten ist Anteil der Hermaphroditen mit dem bag-of-worms (BOW) Phänotyp (bei dem sich die befruchteten, nicht abgelegten Eier innerhalb des Uterus weiterentwickeln und schlüpfen) in allen Silica-Nanopartikel behandelten Gruppen signifikant erhöht (Abb. 4.9, C).

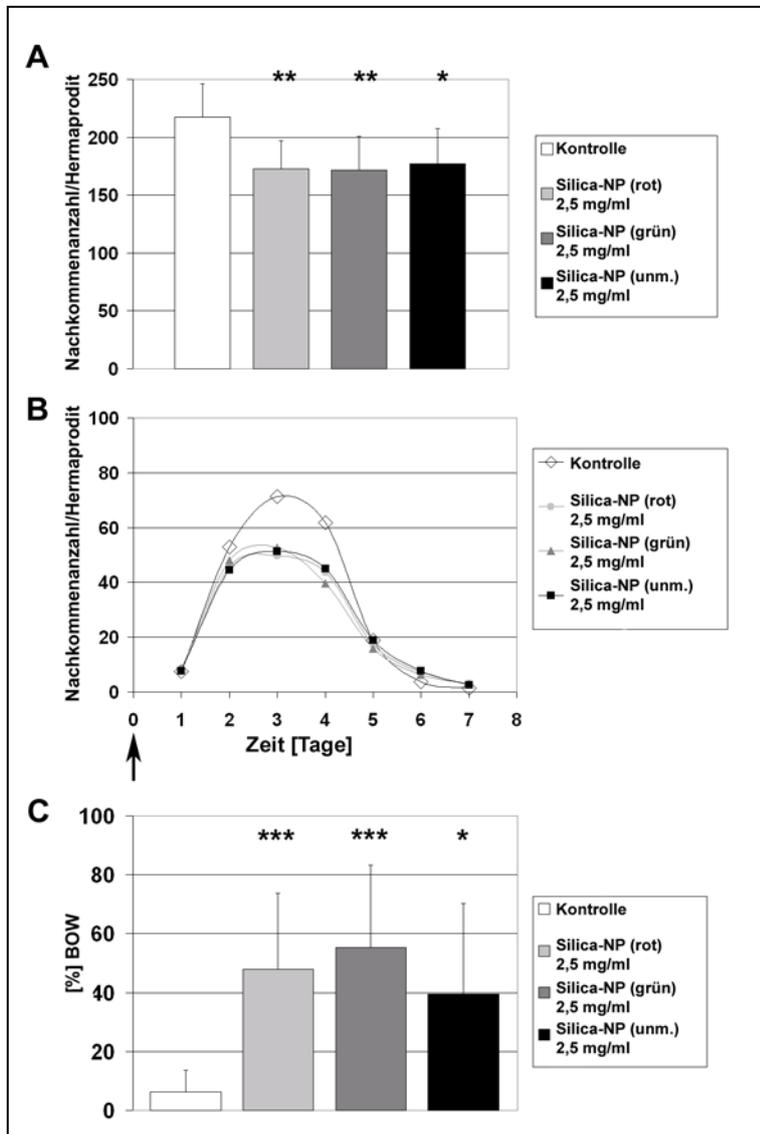


Abbildung 4.9 Silica-Nanopartikel induzieren eine Reduktion der Nachkommenproduktion und eine Erhöhung der BOW Inzidenz

C. elegans Hermaphroditen wurden wie angegeben mit Silica-Nanopartikeln behandelt. Die Hermaphroditen wurden täglich auf frische NGM-Platten umgesetzt und die verbleibenden Nachkommen gezählt. **A** Gesamte Nachkommenschaft eines Hermaphroditen innerhalb von 7 Tagen post L4.

B Verlauf der Nachkommenproduktion innerhalb von 7 Tagen post L4. Der Pfeil markiert den Beginn der Behandlung mit Silica-Nanopartikeln. Tag 0 entspricht dem Larvalstadium L4.

C Anteil der beim Experiment aufgetretenen „bag-of-worms“ (BOW) Mittelwerte (+ Standardabweichung) von drei Experimenten (n=96)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.5.2 Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit bei Behandlung ab Adult

Der experimentelle Aufbau der in 4.3.1 beschriebenen Untersuchung kann die Möglichkeit der Einwirkung der Silica-Nanopartikelbehandlung auf den letzten Entwicklungsschritt vom L4 Stadium zum adulten Hermaphroditen nicht erörtern. Ob Silica-Nanopartikel mit diesem Entwicklungsschritt, bei dem auch die Entwicklung des Eiablageapparats abgeschlossen wird (Hall und Altun 2008; Sternberg 2005), interferieren und dadurch die vorangehend beschriebenen Effekte auslösen, sollte in etwas modifizierten Nachkommen-Auszählungsexperimenten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Beginn der Silica-Nanopartikelbehandlung um einen Tag auf Tag 1 verschoben, d. h. dass ausschließlich adulte Hermaphroditen behandelt wurden. Bei diesem Aufbau produzieren die unbehandelten Hermaphroditen innerhalb der 7 Tage 214 ± 13 Nachkommen (Abb. 4.10, A). Die Nachkommenanzahl der mit Silica-Nanopartikeln behandelten Hermaphroditen sinkt signifikant auf 165 ± 13 bei Silica-NP (rot), 183 ± 14 bei Silica-NP (grün) und 193 ± 15 bei Silica-NP (unm.). Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Nachkommenproduktion besonders an Tag 3 (Abb. 4.10, B) und ein signifikant erhöhter Anteil von BOW Phänotypen auf 47 bis 51% bei den Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen (Abb. 4.10, C). Damit kann ausgeschlossen werden, dass Silica-Nanopartikel mit der Entwicklung des Eiablageapparats interferieren und dadurch die beobachteten Effekte verursachen.

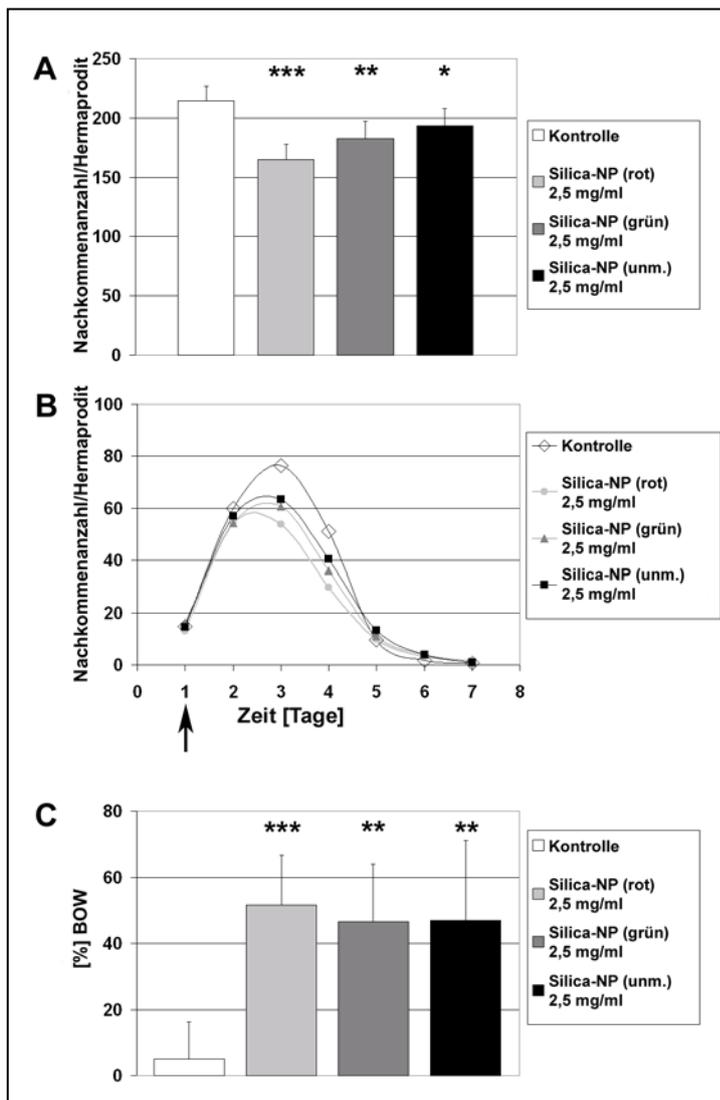


Abbildung 4.10 Die Behandlung mit Silica-Nanopartikeln nach Abschluss der Entwicklung reduziert die Nachkommenproduktion und induziert den BOW-Phänotyp

C. elegans Hermaphroditen wurden wie angegeben mit Silica-Nanopartikeln behandelt. Die Hermaphroditen wurden täglich auf frische NGM-Platten umgesetzt und die verbleibenden Nachkommen gezählt. **A** Gesamte Nachkommenschaft eines Hermaphroditen innerhalb von 7 Tagen post L4. **B** Verlauf der Nachkommenproduktion innerhalb von 7 Tagen post L4. Der Pfeil markiert den Beginn der Behandlung mit Silica-Nanopartikeln. Tag 1 entspricht adulten Hermaphroditen. **C** Anteil der beim Experiment aufgetretenen „bag-of-worms“ (BOW) Mittelwerte (+ Standardabweichung) von drei Experimenten (n=60)
 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.5.3 Silica-Nanopartikel induzierter Effekt auf Nachkommenproduktion und BOW Häufigkeit bei gleichzeitiger Behandlung mit Ethosuximid

Um zu untersuchen, inwiefern der beobachtete Silica-Nanopartikel induzierte Effekt auf die Nachkommenproduktion und die BOW Inzidenz die intrinsische muskuläre Funktion des Eiablage-Apparats beeinflusst, wurden die Hermaphroditen mit dem Antiepileptikum Ethosuximid behandelt. Für Ethosuximid wurde bereits gezeigt, dass es die Eiablage-Funktion in wt Hermaphroditen stimulieren kann (Evason et al. 2005). Die gesamte Nachkommenproduktion innerhalb von 7 Tagen umfasst in unbehandelten Hermaphroditen $262 \pm 42,4$ Embryonen oder Larven (Abb. 4.11, A). Die Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen legen mit $192 \pm 19,9$ signifikant weniger Nachkommen ab. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Silica-Nanopartikeln und Ethosuximid in einer Konzentration von 2 mg/ml steigt die Anzahl der Nachkommen auf $254 \pm 10,9$ ($219 \pm 32,5$ bei Silica-Nanopartikel und 4 mg/ml Ethosuximid). Dem Zeitverlauf der Nachkommenproduktion ist zu entnehmen, dass die drei Ethosuximid behandelten Gruppen mehr Nachkommen nach Tag 5 produzieren (Abb. 4.11, B). Die Inzidenz des BOW-Phänotyps nimmt, ausgehend von $31 \pm 12,5\%$ bei Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen, nach gleichzeitiger Behandlung mit Ethosuximid ab: $15 \pm 10,5\%$ mit 2 mg/ml Ethosuximid und $4 \pm 4,8\%$ mit 4 mg/ml Ethosuximid (Abb. 4.11, C).

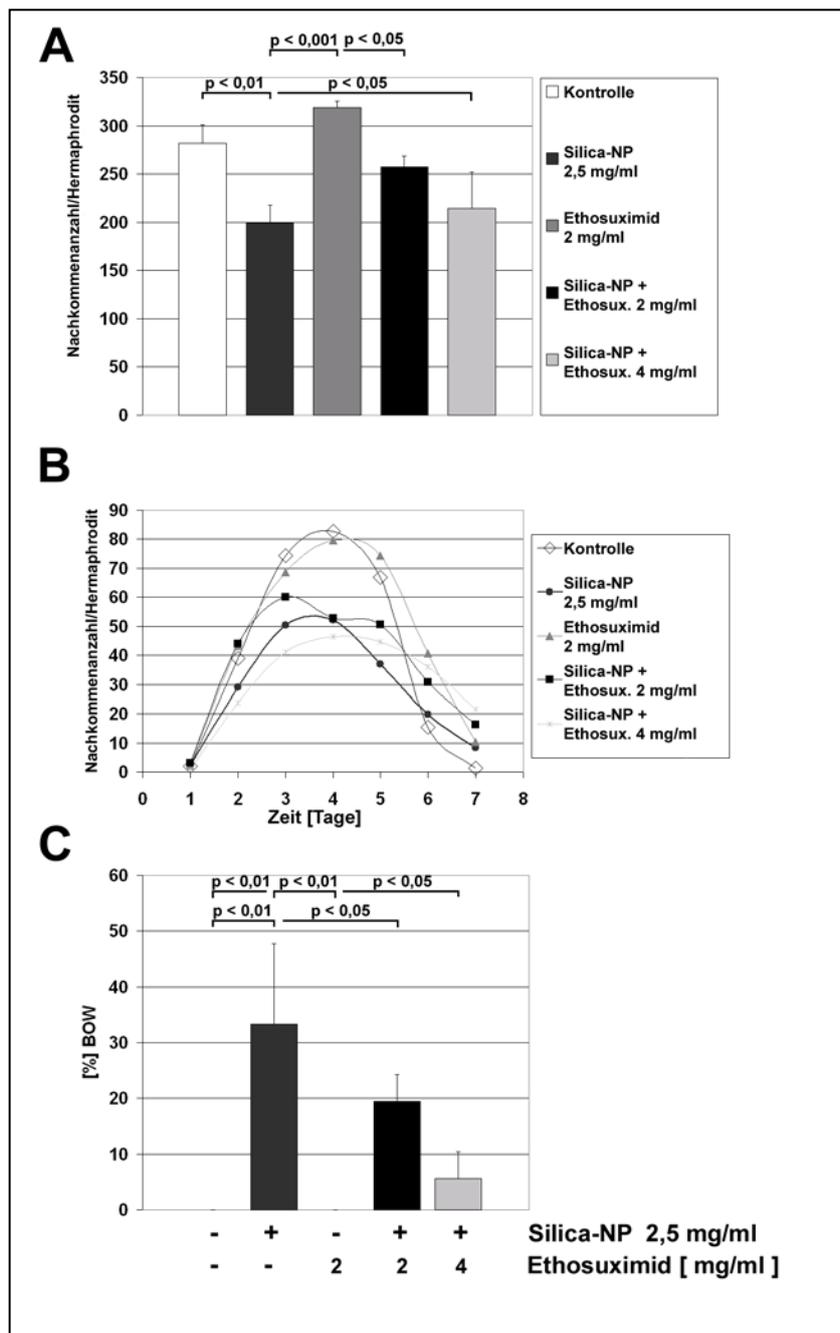


Abbildung 4.11 Der Silica-Nanopartikel induzierte Effekt auf die Nachkommenproduktion und den BOW-Phänotyp wird durch Ethosuximid wiederhergestellt

C. elegans Hermaphroditen wurden ab dem L4 Stadium wie angegeben mit Silica-Nanopartikeln und/oder Ethosuximid behandelt. Die Hermaphroditen wurden täglich auf frische NGM-Platten umgesetzt und die verbleibenden Nachkommen gezählt. **A** Gesamte Nachkommenschaft eines Hermaphroditen innerhalb von 7 Tagen post L4. **B** Verlauf der Nachkommenproduktion innerhalb von 7 Tagen post L4. **C** Anteil der beim Experiment aufgetretenen „bag-of-worms“ (BOW). Mittelwerte (+ Standardabweichung) von drei Experimenten (n=36). Signifikanz wurde mit Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) und Tukeys-Post-hoc Test überprüft.

4.5.4 Zeitverlauf des Auftretens von BOW-Phänotypen

Um zu untersuchen wie sich die Inzidenz von BOW im zeitlichen Verlauf darstellt, wurden *C. elegans* Hermaphroditen mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt über 7 Tage kultiviert. Neben dem Wildtyp-Stamm N2 wurden außerdem die zwei transgenen Stämme RW1596 und wyls97 eingesetzt. Beim Zeitverlauf (Abb. 4.12, Graphen) ist erkennbar, dass es sich beim BOW-Phänotyp um einen altersassoziierten Phänotyp handelt. Bei unbehandelten Hermaphroditen der drei Stämme treten BOW ab Tag 5 (RW1596, wyls97) bzw. Tag 6 (N2) zunehmend auf. Die mit Silica-Nanopartikeln behandelten Tiere zeigen einen anderen Kurvenverlauf. Auffällig dabei ist, dass bei den drei Stämmen die BOW bereits an Tag 3 gehäuft auftreten. Dies ist insbesondere beim Stamm RW1596 zu beobachten, bei dem die BOW Inzidenz an Tag 4 annähernd auf das Niveau von unbehandelten Würmern absinkt. Es kann also zwischen einer Silica-Nanopartikel induzierten BOW-Population und einer altersassoziierten BOW-Population unterschieden werden. Über den Zeitraum von 7 Tagen betrachtet, zeigt sich, wie in den Balkendiagrammen dargestellt, in den Silica-Nanopartikel behandelten Tieren eine signifikante Zunahme des BOW-Anteils. Mit $22,5 \pm 8\%$ beim Stamm wyls97 und $13,6 \pm 3\%$ beim Stamm RW1596 ist im Vergleich zum Wildtyp ($5,1 \pm 7\%$) der BOW-Anteil bereits bei den Kontrollen erhöht.

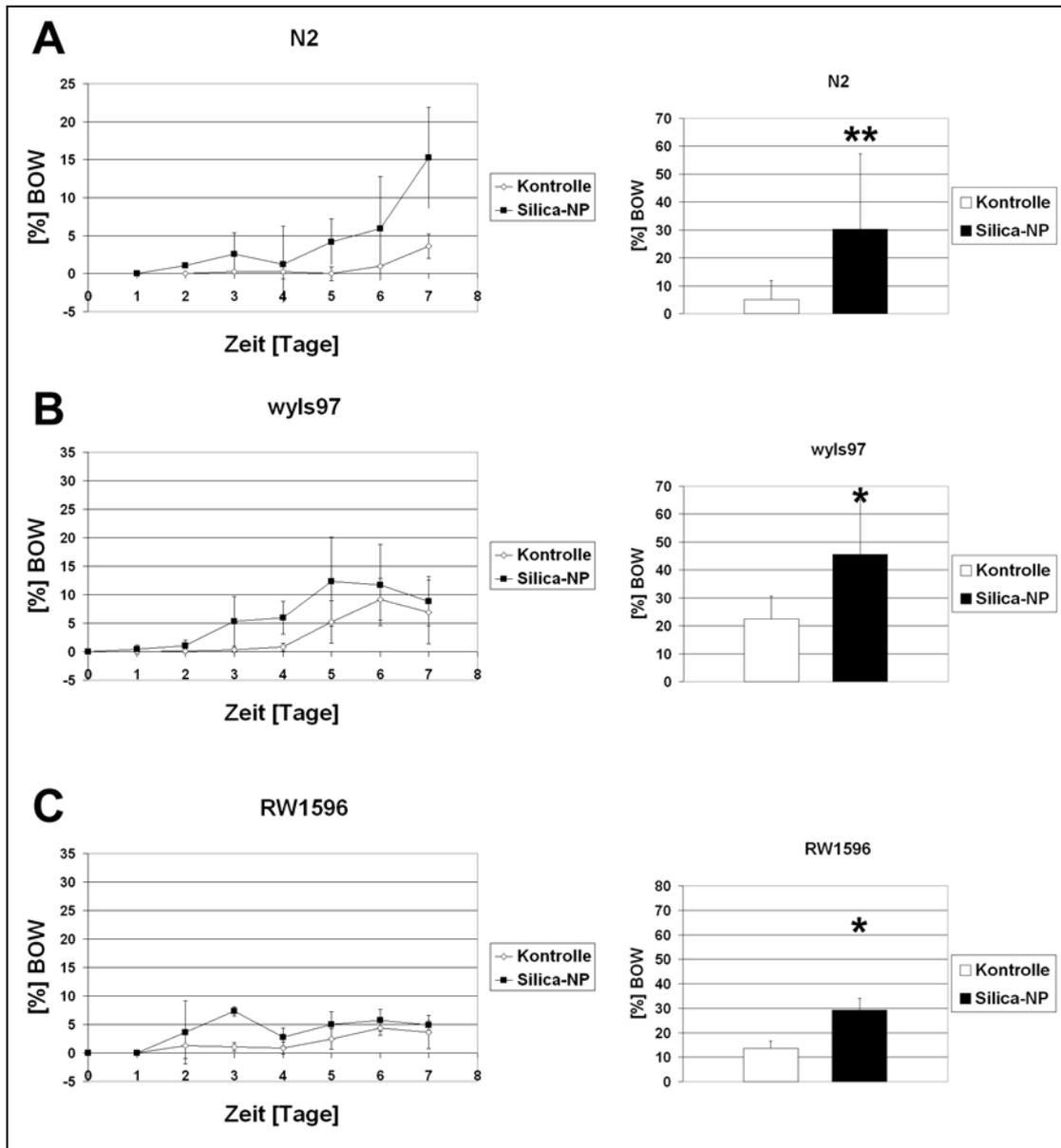


Abbildung 4.12 Zeitlicher Verlauf der Inzidenz von BOW

Hermaphroditen wurden mit Silica-Nanopartikeln oder Wasser (Kontrolle) behandelt. Das Vorkommen von BOW wurde über sieben Tage protokolliert. Die Graphen zeigen die tägliche Häufigkeit von BOW in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen. Die Balkendiagramme repräsentieren den gesamten prozentualen Anteil von BOW, der innerhalb von 7 Tagen aufgetreten ist. Im Experiment wurden Tiere des **A** Wildtyp-Stamms N2, **B** des Stamms wyls97 und **C** des Stamms RW1596 eingesetzt. Mittelwerte (\pm / + Standardabweichung) von vier Experimenten ($n \geq 265$, A; $n \geq 527$, B; $n \geq 872$, C) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.6 Morphologie der HSN Motoneuronen

Silica-Nanopartikel induzieren eine Zunahme des BOW-Phänotyps. Bei diesem Phänotyp spielt der Eiablageapparat die entscheidende Bedeutung. Erst wenn die Funktion des Eiablageapparats gestört ist, kann sich der BOW-Phänotyp, unter der Annahme der normalen Entwicklung der Nachkommen des Hermaphroditen, entwickeln. Die Funktion des Eiablageapparats wird in *C. elegans* durch insgesamt acht Motoneurone kontrolliert. Hierbei sind die zwei HSN Motoneurone (HSNL und HSNR) für die Eiablage nicht verzichtbar (Trent et al. 1983). Inwiefern Silica-Nanopartikel die Morphologie der für die Eiablage kritischen HSN Motoneurone modulieren, sollte im Folgenden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der transgene Stamm wyls97 verwendet, der freundlicherweise von Prof. Kang Shen (Stanford, CA, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Unter der Kontrolle des *unc-86* Promotors exprimiert dieser Stamm GFP, das mit dem *C. elegans*-spezifischen Myristilisations-Signal versehen ist (Adler et al. 2006) und dadurch an der Zellmembran lokalisiert. Zusätzlich exprimieren diese Tiere ein mCherry::RAB-3 Fusionsprotein das unter der Kontrolle des *unc-86* Promotors steht und zellulär an synaptischen Vesikeln lokalisiert. Die Behandlung mit Silica-Nanopartikeln erfolgte analog zu den vorausgegangenen Experimenten. Die Morphologie der HSN Motoneuronen wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. In den Mikrografien (Maximum-Intensitäts-Projektionen) ist exemplarisch die Morphologie von HSNL in adulten Hermaphroditen dargestellt, die 3 bzw. 7 Tage mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt wurden (Abb. 4.13, A). Das grüne Fluoreszenzsignal zeigt, neben dem Axon von PLML (Pfeil), das Soma und das Axon von HSNL. Das HSNL Axon verläuft vom Soma zunächst ventral bis zur Mittellinie und anschließend Richtung anterior. Im Bereich der Vulva ist die Axonlage dorsal verlegt. Das ist der Bereich des lokalen Neuropils, wo die HSN Motoneuronen mit VC Motoneuronen und Muskelarmen der vm2 Vulvamuskeln Synapsen bilden. In den Mikrographien ist die Lokalisierung der Synapsen (in den mCherry::RAB-3 Varikositäten) mithilfe des roten Fluoreszenzsignals von

mCherry::RAB-3 möglich. Ferner sind fokale RAB-3 Signale auch cytoplasmatisch im Soma erkennbar. Zwischen den unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen sind keine morphologischen Unterschiede feststellbar, die außerhalb der morphologischen Variabilität der HSN liegen. In der quantitativen Analyse der Axonlänge (gemessen vom Soma bis zur Mitte der Neuropilregion) ist kein signifikanter Unterschied feststellbar (Abb. 4.13, B). Auch die Fläche des Soma unterscheidet sich nicht signifikant zwischen unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen (Abb. 4.13, C). Die Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen zeigen keine signifikante Veränderung in der Anzahl der mCherry::RAB-3 Varikositäten (Abb. 4.13, D)

Es wurde auch die Morphologie der HSNL Motoneuronen in BOW-Phänotypen untersucht, die während der Behandlungsdauer aufgetreten waren. Die Dokumentation des GFP-Signals war in BOW-Phänotypen nicht möglich. Der Stamm wyls97 exprimiert noch zusätzlich GFP unter der Kontrolle des *odr-1* Promotors in den sensorischen Neuronen AWC. Diese Expression ergibt ein starkes GFP-Signal im anterioren Teil der Nachkommen bereits vor dem L1-Stadium, was dazu führt, dass das GFP-Signal in den HSN Motoneuronen überstrahlt wird und auch mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nicht aufgezeichnet werden kann. Die Mikroskopische Auswertung erfolgte anhand des mCherry::RAB-3 Signals und ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen Maximum-Intensitäts-Projektionen aus Z-Scans von 10- 15 µm Höhe. Die Durchlicht-Mikrographien des differenziellen Interferenzkontrast veranschaulichen die Lage der Vulva. Das Fusionsprotein mCherry::RAB-3 lokalisiert an den Synapsen (Stern) und im Soma (Pfeilspitze). Zwei Aufnahmen je Gruppe geben einen Überblick über die morphologische Variabilität zwischen einzelnen Hermaphroditen. Es ist in diesem Zusammenhang kein morphologischer Unterschied zwischen unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten *C. elegans* Hermaphroditen festzustellen.

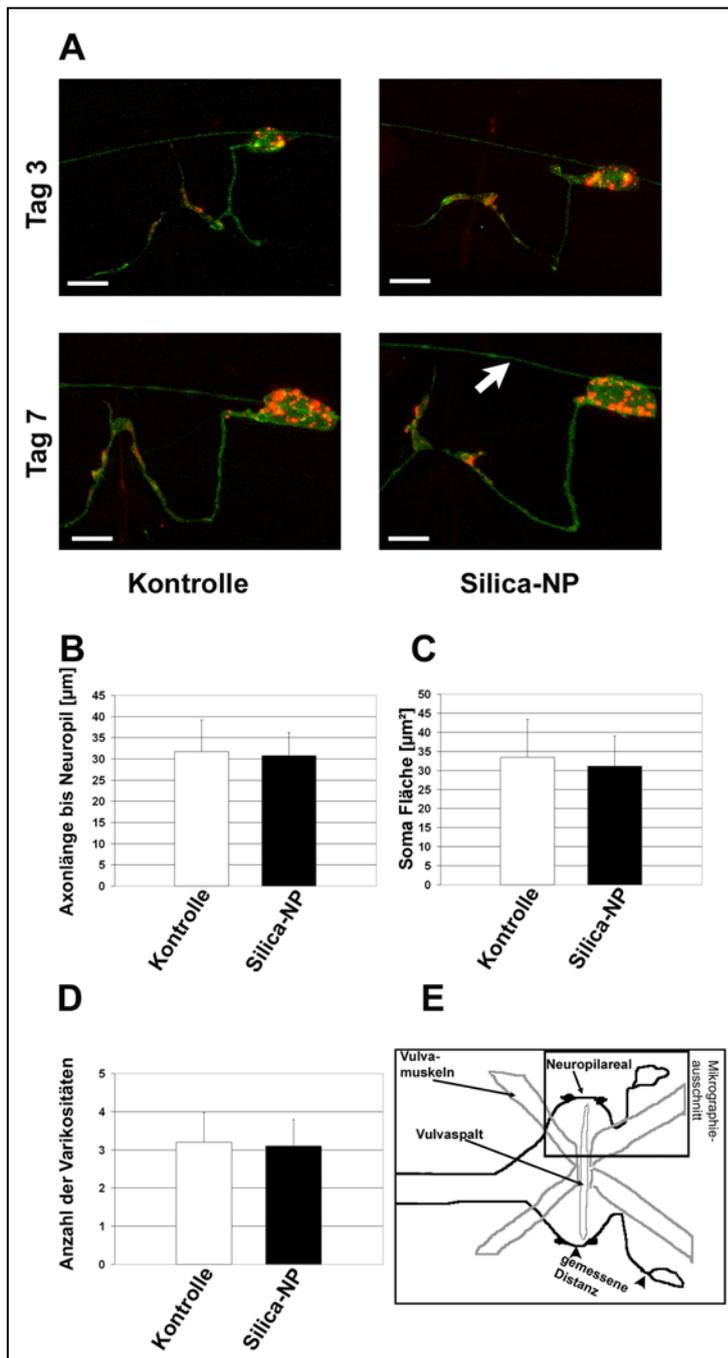


Abbildung 4.13 Morphologie von HSN Motorneuronen in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten adulten Hermaphroditen.

Hermaphroditen des transgenen Stamms wyls97 wurden ab dem L4 Stadium mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt. Nach 3 bzw. 7 Tagen nach dem L4 Stadium wurde die Morphologie der HSN mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. **A** Maximum-Intensitäts-Projektionen von Z-Schnitt Aufnahmen einer Höhe von 10 – 17 μm . Die Nematoden exprimieren myristiliertes GFP (grün) und ein mCherry::RAB-3 Fusionsprotein (rot) in verschiedenen Neuronen. Die Mikrographien zeigen HSNL. Der Pfeil zeigt die Lage des Fortsatzes des mechanosensorischen Neurons PLML. **B** Quantitative Auswertung der Axonlänge von HSN Neuronen vom Soma bis zum lokalen Neuropil. **C** Quantitative Auswertung der Somafläche von HSN Neuronen. **D** Quantitative Auswertung der Anzahl der mCherry::RAB-3 Varikositäten **E** Schema der Anatomie der Vulvaregion von ventral. Bei B bis D: Balken repräsentieren Mittelwerte (+ Standardabweichung) von Analysen ($n \geq 23$) Größenbalken: 5 μm

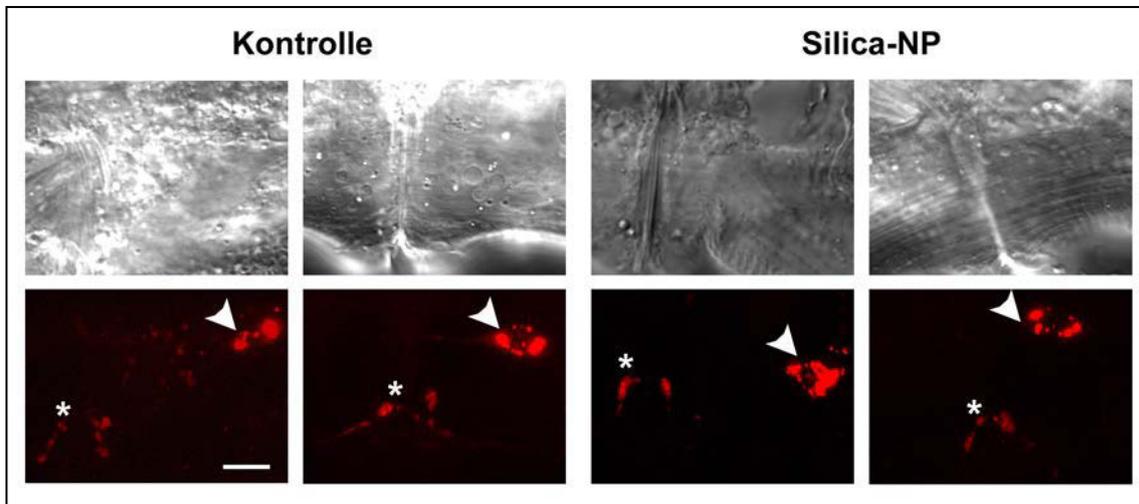


Abbildung 4.14 Morphologie von HSNL in Hermaphroditen mit BOW-Phänotyp

Hermaphroditen des transgenen Stamms *wyls97* wurden ab dem L4 Stadium mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt. Die Morphologie der HSNL in Hermaphroditen mit innerlich geschlüpfter Nachkommenschaft wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Aufnahmen des differentiellen Interferenzkontrasts zeigen die Lage der Vulva. Die Nematoden exprimieren ein mCherry::RAB-3 Fusionsprotein (rot). Sterne zeigen die Lage der mCherry::RAB-3 Varikositäten und die Pfeilspitzen die Lage des Soma. Größenbalken: 5 µm

4.7 Morphologie der Vulvamuskeln

Eine mögliche Silica-Nanopartikel induzierte Veränderung der Morphologie der Vulvamuskeln wurde mithilfe des transgenen Stamms RW1596 untersucht. Der Stamm exprimiert im genetischen Hintergrund einer *myo-3* null-Mutante ein Fusionsprotein aus GFP und der schweren Myosinkette MHC A (engl. myosin heavy chain) die von *myo-3* codiert wird (Campagnola et al. 2002). Hierzu wurden die Hermaphroditen ab dem L4 Stadium mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt. Nach 3 bzw. 7 Tagen wurden die Hermaphroditen für die Mikroskopie präpariert und die Morphologie der Vulvamuskeln anhand der GFP Fluoreszenz ausgewertet (Abb. 4.15, A). Die adulten Hermaphroditen zeigen eine X-förmige Anordnung der Vulvamuskelzellen in denen die Myosinfilamente grün fluoreszieren.

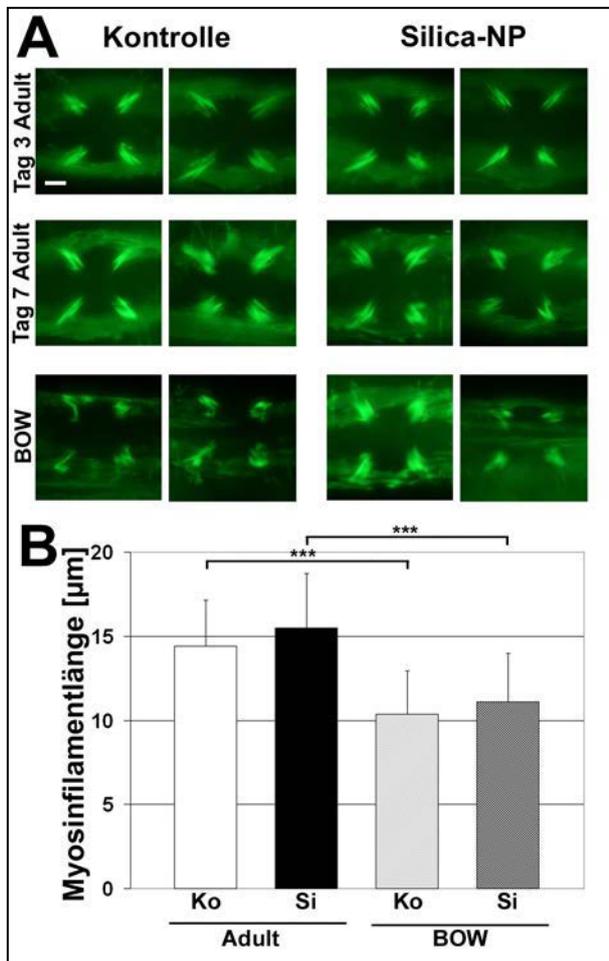


Abbildung 4.15 Morphologie der Vulvamuskeln in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen

Hermaphroditen des transgenen Stamms RW1596 wurden ab dem L4 Stadium mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt. Nach 3 bzw. 7 Tagen nach dem L4 Stadium wurde die Morphologie der Vulvamuskeln mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. **A** GFP Fluoreszenz entspricht den Myosinfilamenten in Muskelzellen. **B** Quantitative Auswertung der Myosinfilamentlänge der nicht-gestreiften Vulvamuskeln in adulten Hermaphroditen und Nematoden mit innerlich geschlüpfter Nachkommenschaft (BOW). Größenbalken: 10 μm

Zwischen der Kontrolle und den Silica-Nanopartikel behandelten Adulten sind keine morphologischen Unterschiede erkennbar. Hingegen zeigen die BOW-Phänotypen insgesamt Veränderungen der Sarkomerintegrität und verkürzte Myosinfilamente, wie die quantitative Analyse bestätigt (Abb. 4.15, B). Die Sarkomerintegrität der schiefgestreiften Körperwandmuskeln zeigt in adulten Hermaphroditen keine Auffälligkeiten nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln (Beobachtung nicht gezeigt).

4.8 Untersuchungen zur Eiablage

Die Untersuchungen der Nachkommenproduktion von Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen (siehe 4.5) haben ergeben, dass insbesondere im Zeitraum zwischen dem zweiten und dem vierten Tag der Silica-Nanopartikel Behandlung die Nachkommenanzahl signifikant reduziert ist. Inwiefern der dabei gleichzeitig zunehmend auftretende BOW-Phänotyp dafür verantwortlich ist, lässt sich aus den bisherigen Ergebnissen nicht ableiten. Um zu untersuchen, ob die Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen die Eier im Uterus zurückhalten, wurde die Anzahl der nicht abgelegten Eier im Uterus bestimmt (Abb. 4.16). Nach 40 Stunden Behandlung mit Silica-Nanopartikeln beinhalten die Hermaphroditen $24,2 \pm 3,6$ Eier (Kontrolle: $26,3 \pm 2,3$). Dieser Wert sinkt an Tag 3 der Behandlung, d. h. zum Zeitpunkt der maximalen Nachkommenproduktion, auf $4,9 \pm 1,9$ (Kontrolle: $3,9 \pm 0,8$). Insgesamt zeigt der Graph keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Eier im Uterus zwischen der Kontrolle und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Nachkommenproduktion reduziert ist. Es lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Zunahme des BOW Anteils zu.

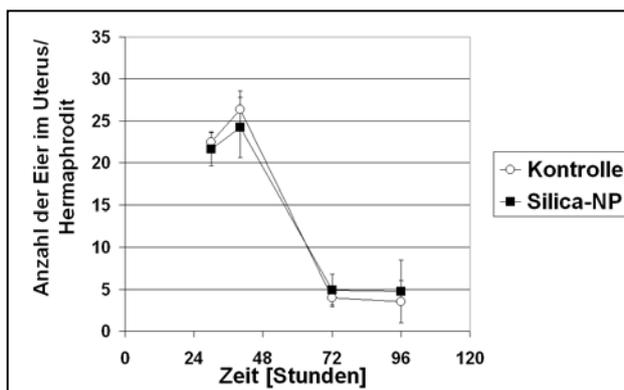


Abbildung 4.16 Quantifizierung der nicht abgelegten Eier im Verlauf der Behandlung mit Silica-Nanopartikeln

Wildtyp Hermaphroditen wurden ab dem L4 Stadium für 30, 40, 72 oder 96 Stunden mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt. Die Anzahl der Eier im Uterus wurde ermittelt. Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von drei Experimenten ($n=90$)

Da bei den gegebenen Ergebnissen die Anzahl der im Uterus verbliebenen Eier nicht als Maß für die Funktionalität des Eiablageapparats dienen kann, weil durch die Silica-Nanopartikelbehandlung weniger Nachkommen produziert werden, musste ein anderer Test eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit, wie die Funktion des Eiablageapparats untersucht werden kann, geht davon aus, dass die Eier normalerweise im Gastrula-Stadium abgelegt werden. Spätere Stadien deuten auf eine längere Verweildauer der Eier im Uterus hin, und damit auf eine modulierte Eiablagefunktion. Um den Silica-Nanopartikel Effekt dieser Annahme folgend zu untersuchen, wurden L4 Larven für 3 Tage mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt. Die innerhalb von 30 Minuten abgelegten Eier wurden auf das Entwicklungsstadium hin untersucht. Das Balkendiagramm zeigt, dass nach Silica-Nanopartikel Behandlung der Anteil des 9-32 Zellstadiums signifikant abnimmt, während der Anteil der späten post-Komma Stadien signifikant zunimmt. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Silica-Nanopartikel Behandlung die Funktion des Eiablageapparats moduliert.

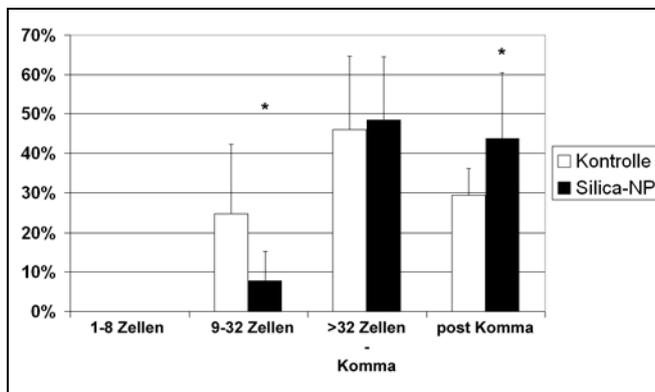


Abbildung 4.17 Entwicklungsstadien der abgelegten Eier von unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen

Hermaphroditen wurden ab dem L4 Stadium für 3 Tage mit Wasser (Kontrolle) oder Silica-Nanopartikeln behandelt. Das Entwicklungsstadium der innerhalb von 30 Minuten abgelegten Eier wurde untersucht. Mittelwerte(+Standardabweichung) von vier Experimenten (n=200)

5 Diskussion

5.1 Silica-Partikel bilden in Zelllysat eine Proteincorona

In der vorliegenden Arbeit wurde in Präzipitationsexperimenten gezeigt, dass amorphe Silica-Partikel mit zellulären Proteinen interagieren. Silica-Partikel adsorbieren Proteine aus Zelllysat und aus einer Proteinlösung, was anhand des Proteins Topoisomerase I gezeigt wurde. Die von feinen und nanoskaligen Silica-Partikeln adsorbierten Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert und konnten im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 4.1). Dabei hat ein erheblicher Anteil der Topoisomerase I aus dem Zelllysat mit den Silica-Partikeln Komplexe gebildet, wie anhand der Signalintensität in den Überstand-Fractionen erkennbar ist. Im Fall der Proteinlösung ist anzunehmen, dass alle Proteinmoleküle von den Silica-Partikeln adsorbiert wurden, weil Topoisomerase I in der Überstand-Fraktion im Immunoblot nicht mehr detektierbar war. Da sich sedimentierbare Partikel-Protein-Komplexe sowohl in der Proteinlösung als auch im Zelllysat gebildet haben, kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Prozess andere Biomoleküle, wie DNA oder Lipide, wahrscheinlich nicht beteiligt sind. Hierbei wurde erstmals gezeigt, dass Silica-Partikel auch mit zellulären Proteinen in einem Zelllysat Komplexe bilden. Wenngleich dort andere Partikeldurchmesser, Inkubationsbedingungen und z. T. Methoden zum Einsatz kamen, bestätigt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit insgesamt die Resultate vorausgegangener Studien, die für Hühnerei-Lysozym und HCAI eine Adsorption an Silica-Nanopartikel beschrieben haben (Vertegel et al. 2004; Lundqvist et al. 2004).

Die Untersuchungen zur Zeitkinetik der Proteinadsorption durch Silica-Partikel erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch die Variation der Inkubationszeit. Die Ergebnisse zeigen, dass sich im Zelllysat ein Gleichgewicht von nicht-adsorbierten und an Silica-Partikeln adsorbierten Proteinen bereits nach 5 Minuten eingestellt hat. Im Verlauf der Inkubationszeit mit den 500 nm Silica-Partikeln über 1, 4, 8 bis 16 Stunden konnte keine Veränderung dieses Gleichgewichts festgestellt werden.

Analog war bei Verwendung der 50 nm Silica-Nanopartikel auch keine Desorption nach 16 Stunden Inkubationsdauer erkennbar. Die Zeitkinetik der Adsorption von Topoisomerase I an Silica-Partikel konnte in der gewählten Zeitspanne in den Partikelfällungsexperimenten nicht aufgelöst werden. Insgesamt wird aber bei Protein-Partikel-Komplexen von Assoziationsraten-Konstanten zwischen 100 Sekunden und mehreren Stunden und von Lebensdauern im Bereich von Microsekunden bis Wochen berichtet (Cedervall et al. 2007). So wurde in einer anderen Studie die Adsorption von Proteinen in humanem Serum an bioabbaubare 312 nm poly(D,L-Laktat)-Partikel untersucht. Die Inkubationszeiten betragen dabei 5 bis 60 Minuten. Die Autoren berichten dabei, dass im Verlauf der Inkubation zunächst Albumin adsorbiert, im Verlauf der Inkubation jedoch desorbiert wurde. Dafür wurde mit längerer Inkubationsdauer zunehmend Apolipoprotein E adsorbiert (AlléAaemann et al. 1997). Somit kann für Topoisomerase I unter den gewählten Bedingungen eine hohe Affinität für die Silica-Partikel angenommen werden. Gleichzeitig erlauben die Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass Topoisomerase I als Bestandteil der langlebigen Proteincorona von Silica-Partikeln in Zelllysate angesehen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Abhängigkeit der Proteinadsorption an Silica-Partikel im Hinblick auf die Partikelkonzentration untersucht. Hierbei ist erkennbar, dass der Anteil von Topoisomerase I im Pellet, d. h. an Silica-Partikel adsorbiert, direkt proportional zur eingesetzten Partikelkonzentration ist (Abb. 4.3). Damit einhergehend ist die Zunahme des Topoisomerase I Anteils im Überstand, also der nicht adsorbierten Proteine, mit sinkender Partikelkonzentration. Dieses Ergebnis zeigt, dass Silica-Partikel im Zelllysate einen stöchiometrischen Anteil von Proteinen adsorbieren. Es kann davon auch abgeleitet werden, dass das Verhältnis von adsorbierten und nicht-adsorbierten Proteinen als Quotient der Signalintensität der Immunoblotbande im Pellet durch die Signalintensität im Überstand dargestellt werden kann.

Die Zusammensetzung der langlebigen Proteincorona von Silica-Partikeln in Zelllysate wurde anhand von ausgewählten zellulären Proteinen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Adsorption von Proteinen an der Oberfläche von Silica-

Partikeln nicht unspezifisch ist. Ausgehend von der Adsorption von Topoisomerase I an die Silica-Partikel hätte die Interaktion mitunter durch elektrostatische Wechselwirkungen erklärt werden können. Die bei den Partikelfällungsexperimenten verwendeten Silica-Partikel weisen, laut Angaben des Herstellers, bei neutralem pH ein Zeta-Potential von etwa -50 mV auf. Sie sind bei den Inkubationsbedingungen (RIPA-Puffer pH 7,4) also negativ geladen. Topoisomerase I weist einen errechneten isoelektrischen Punkt von $pI=9,33$ auf (P113887;http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi), was bei der Inkubation einer positiven Nettoladung entspricht. Allerdings könnte das nicht erklären, dass NuMA mit einem $pI=5,63$ (Q14980;http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi) dann, wie gezeigt, von feinen und nanoskaligen Silica-Partikeln adsorbiert wird (Abb. 4.4) während PCNA mit einem $pI=4,57$ (P12004;http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi) im Überstand verbleibt. Bei der Adsorption müssen also noch weitere Wechselwirkungen, wie beispielsweise van-der-Waals Kräfte, eine Rolle spielen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Adsorption der Proteine im Zelllysate von der Affinität der Proteine für die Silica-Partikel abhängt. Somit ergibt sich bei den Inkubationsbedingungen im Zelllysate eine spezifische Proteincorona, deren Zusammensetzung mit der Größe der eingesetzten Silica-Partikel variiert. Diese Annahme kann auch durch die Betrachtung der Coomassie-Bandenmuster in den Pellet-Fractionen der feinen und nanoskaligen Silica-Partikel abgeleitet werden (Abb. 4.4, C). Die gleiche Feststellung machten die Autoren einer kürzlich veröffentlichten Studie (Tenzer et al. 2011), die die langlebige Proteincorona von Silica-Partikeln in humanem Blutplasma untersuchten. Tenzer et al. konnten mittels quantitativer Massenspektrometrie von Sedimentproben zeigen, dass von den etwa 2000 bekannten Proteinen im Blutplasma (Farrah et al. 2011) 125 an Silica-Nanopartikel adsorbierten. 37% der identifizierten Plasmaproteine zeigten quantitative Unterschiede im Vorkommen in der jeweiligen Proteincorona der dabei verwendeten Silica-Nanopartikel mit Durchmessern von 20, 30 bis 100 nm. Wenn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der vorausgegangenen Studie der von Mikecz-Arbeitsgruppe (Chen und von Mikecz 2005) verglichen werden, ergeben sich Parallelen zwischen den Interaktionen von Silica-Nanopartikeln in Epithelzellen und

denen *in vitro*. So führte die Behandlung von HEP-2 Zellen mit Silica-Nanopartikeln zu aberranten Topoisomerase I Aggregaten im Zellkern, die u. a. mit Fibrillarin, TBP und Huntingtin kolokalisierten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Topoisomerase I, Fibrillarin, TBP und Huntingtin von Silica-Nanopartikeln spezifisch adsorbiert werden. Andererseits fällt auf, dass PCNA nicht an Silica-Nanopartikel adsorbiert wird und auch nicht in den Topoisomerase I Aggregaten kolokalisierte. Die vorliegende Arbeit beschreibt demnach eine Silica-Nanopartikel Wechselwirkung *in vitro* die möglicherweise in Zellen zu Proteinaggregation führt.

Die Untersuchung der Interaktionen von Silica-Partikeln mit Proteinen in Gewebelysat von *C. elegans* hat ergeben, dass Proteine spezifisch adsorbiert werden. Im Immunoblot zeigt sich, dass U1-70k spezifisch in der langlebigen Proteincorona vorkommt, während die α - Untereinheiten 1,2,3,5,6&7 des 20 S Proteasoms nicht adsorbiert werden (Abb. 4.5, B). Die Coomassie-Färbung (Abb. 4.5, A) von Proteinen in den Experiment-Fractionen gibt Aufschluss über die relative Häufigkeit von Proteinen im Zelllysat von SK-N-SH Zellen bzw. Gewebelysat von *C. elegans*. Häufige Proteine zeigen dabei eine prominente Bande. Es zeigt sich, dass die Adsorption von Proteinen an Silica-Nanopartikel nicht von deren Häufigkeit im Lysat abhängt. Dies ist besonders beim Zelllysat zu beobachten, wo die eindeutig häufigsten Proteine (prominente Bande bei etwa 60 kDa) nicht in gleichem Maße adsorbiert werden. Aber auch im *C. elegans* Lysat finden sich distinkte Banden, die nicht in der Pellet-Fraktion wiederzufinden sind. Daraus kann gefolgert werden, dass in der Proteincorona von Silica-Partikeln in den Lysaten nicht die häufigsten Proteine entsprechend häufig adsorbiert werden, sondern die Affinität des jeweiligen Proteins für die Silica-Partikeloberfläche entscheidend ist. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Tenzer et al. untermauert, die zeigen, dass es nicht die häufigsten Blutplasmaproteine sind die in der entsprechenden Häufigkeit auch an die Silica-Partikel adsorbierten (Tenzer et al. 2011). Insgesamt lässt sich jedoch aufgrund der unterschiedlichen prominenten Coomassie-Banden in den jeweiligen Pellet-Fractionen auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Proteincorona zwischen Zell- und *C. elegans*-Lysat schließen.

Die Methode, nicht-adsorbierte und an Partikel adsorbierte Proteine durch Sedimentation voneinander zu trennen stellt bislang das beliebteste Vorgehen bei Untersuchungen zur Proteincorona von Partikeln dar. Sie hat jedoch den Nachteil, dass dabei Proteine, die nur schwache Wechselwirkungen mit den Partikeln aufweisen, bei den Aufreinigungsschritten möglicherweise verloren gehen können. Andererseits kann bei den Waschschrinen nicht sichergestellt werden, dass jeweils wieder einzelne Komplexe vorliegen. Dies könnte dazu führen, dass Proteine die eigentlich nicht an die Partikel adsorbiert wurden, wie in einem Schwamm festgehalten werden und dadurch in der Pellet-Fraktion auftreten. Ein weiterer Schwachpunkt könnte bei der vorliegenden Arbeit darin gesehen werden, dass hier gerichtet das Vorkommen ausgesuchter Proteine in der Proteincorona von Silica-Partikeln untersucht wurde. Ein ungerichteter Ansatz, wie die quantitative Massenspektrometrie, könnte diese Lücke schließen.

Zusammenfassend betrachtet konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Silica-Partikel *in vitro* mit zellulären Proteinen aus Zell- bzw. Gewebelysaten sowie aus Proteinlösungen Komplexe bilden, die sedimentiert werden können. Die Bildung dieser Komplexe erfolgt in weniger als 5 Minuten. Die Protein-Partikel-Komplexe sind stabil innerhalb der untersuchten Zeiträume von 5 Minuten bis zu 16 Stunden. Der Anteil des adsorbierten Proteins Topoisomerase I ist jedoch proportional zu der in den Partikelfällungsexperimenten eingesetzten Konzentration der feinen und nanoskaligen Silica-Partikel. Ferner untermauern die Ergebnisse die Annahme, dass die Zusammensetzung der entstehenden Proteincorona nicht unspezifisch ist, sondern von der Affinität bestimmter Proteine zu der Oberfläche der Silica-Partikel und deren mittlerer Größe abhängt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen, ergeben sich Fragen, die in zukünftigen Studien zur weiteren Aufklärung der biologischen Interaktionen von Silica-Nanopartikeln führen könnten. Proteine aus Zell- und Gewebelysate die in hohen Anteilen an Silica-Nanopartikel adsorbiert werden, könnten mittels Massenspektrometrie erkannt werden. Weitergehende massenspektrometrische Analysen der Proteincorona von Silica-Nanopartikeln in Zell- oder Gewebelysate

könnten erfolgen, indem sukzessiv an Silica-Nanopartikel adsorbierte Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und jeweils nach Größenklassen von wenigen kDa massenspektrometrisch untersucht würden. So könnten potenzielle zelluläre Partikel-Interaktionspartner charakterisiert werden, wodurch sich eventuell mit Silica-Nanopartikeln interferierende zelluläre Funktionen identifizieren ließen.

5.2 Silica-Nanopartikel werden von *C. elegans* aufgenommen

Die Aufnahme von Silica-Nanopartikeln durch den Modellorganismus *C. elegans* konnte in der vorliegenden Arbeit fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden. Dabei wurden fluoreszenzmarkierte Silica-Nanopartikel verwendet. Es ist erkennbar, dass die Silica-Nanopartikel eindeutig im Lumen des Pharynx und des Darms lokalisieren (Abb. 4.6, A). Daraus lässt sich ableiten, dass die Silica-Nanopartikel zusammen mit der Nahrung, also *E. coli* –Bakterien aufgenommen wurden. Ob die Silica-Nanopartikel dabei zuerst in die Bakterien gelangten und so durch den Hermaphroditen aufgesogen wurden oder parallel in der Bakteriensuspension in den Verdauungstrakt kamen kann hier nicht geklärt werden. Zumindest wurde die Aufnahme von Silica-Nanoshellpartikeln in *E. coli* –Bakterien mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie gezeigt (Rosemary et al. 2006). Weil die Bakterien im terminalen Bulbus des Pharynx mechanisch aufgeschlossen werden (Altun et al. 2002-2010), ist davon auszugehen, dass die hier beobachteten fluoreszenzmarkierten Silica-Nanopartikel im Nahrungsbrei vorliegen. Für fluoreszenzmarkierte Polystyrol-Nanopartikel konnte in analogen Versuchen die Aufnahme in die Darmzellen, in einem von anterior nach posterior abnehmenden Gradienten, und darüber hinaus noch in sekundäre Organe wie die Gonade gezeigt werden (Pluskota et al. 2009). Diese Art der Aufnahme von Substanzen wurde in anderen Studien mit *C. elegans* auch für *Bacillus thuringiensis* -Toxin (Griffitts et al. 2001) und Quecksilber (Chapleau und Sagermann 2009) beobachtet. Ob einzelne Silica-Nanopartikel eventuell von den Darmzellen aufgenommen wurden, lässt sich

mit der hier eingesetzten fluoreszenzmikroskopischen Methode nicht mit Sicherheit ausschließen. Dies würde elektronenmikroskopische Methoden, aber wahrscheinlich auch elektronendichtere Silica-Nanoshellpartikel erfordern. Damit einhergehend wären auch andere *C. elegans* Gewebe als mögliche Aufnahmerouten noch denkbar gewesen: das exkretorische System, die Vulva und die 26 chemosensorischen Neuronen die in direkter Verbindung zur Außenwelt stehen. So wurde für ultrafeine Manganoxid-Partikel in Ratten die Aufnahme über den Bulbus olfaktorius bis in das Gehirn beobachtet (Fechter et al. 2002; Elder et al. 2006). Fluoreszenzsignale waren in diesen Geweben jedoch nicht detektierbar. Somit kann geschlossen werden, dass Silica-Nanopartikel in den Verdauungstrakt des Hermaphroditen aufgenommen werden.

5.3 Silica-Nanopartikel zeigen keinen Effekt auf die Lebensspanne und die Lipofuscin-Akkumulation in *C. elegans*

In Untersuchungen der Lebensspanne von Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen konnte kein Unterschied zur Lebensspanne von unbehandelten Nematoden festgestellt werden (Abb. 4.7). Die Überlebenskurven zeigen einen ähnlichen Verlauf. Die Akkumulation von Lipofuscin wird durch Silica-Nanopartikel nicht moduliert (Abb. 4.8). Lipofuscin ist eine polymere, durch oxidative Prozesse gebildete Substanz, die hauptsächlich aus quervernetzten Proteinmolekülen besteht (Brunk und Terman 2002). Die Akkumulation von Lipofuscin wird von Substanzen, die die Lebensspanne von *C. elegans* verlängern, wie Flavonoide (Pietsch et al. 2009; Kampkötter et al. 2007) oder Cucurmin (Liao et al. 2011), reduziert. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Silica-Nanopartikel keinen Effekt auf die Akkumulation von Lipofuscin haben, können im Umkehrschluss dadurch die Ergebnisse zur Lebensspanne der Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen validiert werden. Da die Wirkung von Flavonoiden und Cucurmin auf die Reduktion der Akkumulation von Lipofuscin auf deren antioxidativen Kapazitäten beruht, kann

für die vorliegende Arbeit angenommen werden, dass Silica-Nanopartikel im Darm von Hermaphroditen keinen oxidativen Stress induzieren.

5.4 Silica-Nanopartikel induzieren reproduktive Seneszenz in *C. elegans*

In Nachkommen-Auszählungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Nachkommenproduktion in Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen reduziert ist. Innerhalb von 7 Tagen, was der selbst-fertilisierten Reproduktionsphase von *C. elegans* Hermaphroditen entspricht, legen mit Silica-Nanopartikeln behandelte Tiere signifikant weniger Eier (Abb. 4.9, A). Die Reduktion ist besonders deutlich in der Phase der maximalen Reproduktionsaktivität, also 2 bis 4 Tage nach dem L4 Stadium, erkennbar (Abb. 4.9, B). Der Beginn der Reproduktionsphase wird durch die Silica-Nanopartikel Behandlung zeitlich nicht verschoben. Die Reproduktionsphase wird durch die Behandlung mit Silica-Nanopartikeln auch nicht verlängert. Die Reduktion der Nachkommenproduktion kann hier als Abnahme der Reproduktionsaktivität verstanden werden, was als reproduktive Seneszenz bezeichnet wird (Hughes et al. 2007). Der beobachtete Effekt der Abnahme der Nachkommenproduktion tritt auch ein, wenn die Silica-Nanopartikel Behandlung erst nach Abschluss der Entwicklung zum Adulten einsetzt (Abb. 4.10, A und B). Damit einhergehend ist in beiden Fällen die Induktion des BOW-Phänotypen (Abb. 4.9, C; Abb. 4.10, C). Die Möglichkeit, dass die Silica-Nanopartikel mit dem letzten Entwicklungsschritt von L4 zum Adultus interferieren, und dadurch die beobachteten Effekte auslösen, konnte also experimentell ausgeschlossen werden. In den Experimenten wurden die Nachkommen (Embryonen und Larven) ausgezählt die von den Hermaphroditen abgelegt wurden. Aufgrund der erhöhten Inzidenz des BOW Phänotyps könnte die beobachtete Reduktion der Nachkommenproduktion auch damit zusammenhängen, dass die Nachkommen nicht abgelegt werden. Jedoch ergibt die Auszählung der im Uterus verbleibenden Eier, in dem hierbei entscheidenden Zeitfenster zwischen 2 und 4 Tagen post L4, keinen Unterschied zwischen

unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen (Abb. 4.16). Die Silica-Nanopartikel induzierte Reduktion der Nachkommenproduktion kann somit als ein einzelner Effekt, isoliert von der Induktion des BOW-Phänotyps, betrachtet werden. Daraus ergibt sich, dass die Funktion des Reproduktiven Systems (den Eiablage-Apparat hierbei ausklammernd) durch die Silica-Partikel gestört wird. Da die Spermienentwicklung im Hermaphroditen bereits vor dem L4 Stadium initiiert wird und mit der Häutung zum Adultus abgeschlossen ist, kann aufgrund der Ergebnisse ausgeschlossen werden, dass die Silica-Partikel mit dieser Gonadenfunktion interferieren. Zu potenziellen Geweben, die an der Reduktion der Nachkommenproduktion beteiligt sein könnten, zählt die somatische Gonade, die Keimbahn aber auch der Darm, der für die Dotterproduktion verantwortlich ist. Dass die Behandlung mit Nanopartikeln zu einer Reduktion der Reproduktionsfähigkeit von *C. elegans* Hermaphroditen führt, konnte in einer weiteren Studie mit Zink-, Aluminium- und Titan(dioxyd)-Nanopartikeln gezeigt werden (Wang et al. 2009). Ein inhibierender Effekt auf die Nachkommenproduktion in *C. elegans* Hermaphroditen wird aber auch für andere Noxen wie *Bacillus thuringiensis* –Toxin (Hoss et al. 2008) oder das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (Kumar et al. 2010) beschrieben. Die Feststellung, dass Silica-Nanopartikel in der Zellkultur Effekte auslösen, die zusammengenommen Merkmale der replikativen Seneszenz aufweisen (Chen und von Mikecz 2005), erlaubt eine Parallele zu ziehen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Silica-Nanopartikel im Modellorganismus *C. elegans* zu reproduktiver Seneszenz führen.

Zur weiteren Untersuchung des beobachteten Effekts auf die Nachkommenproduktion könnte die Apoptoserate in der Keimbahn ermittelt werden. Eine mögliche Modulation der Dotterproduktion bzw. des Transports könnte mittels eines Reporterstamms (Grant und Hirsh 1999) untersucht werden.

5.5 Silica-Nanopartikel stören die Funktion des Eiablage-Apparats

Die Behandlung mit Silica-Nanopartikeln führt in *C. elegans* Hermaphroditen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, zu einem erhöhten Anteil des bag-of-worms Phänotypen. Innerhalb von 7 Tagen beträgt der Anteil an Tieren die den BOW-Phänotyp zeigen nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln 29 – 45 % (Abb. 4.12, Balkendiagramme). Im Vergleich der drei verwendeten Stämme fällt auf, dass der wyls97 Stamm mit 22% bei den unbehandelten Hermaphroditen eine höhere BOW Inzidenz aufweist als der Wildtyp mit 5%. Wie aus den Graphen ersichtlich (Abb. 4.12, Graphen), handelt es sich bei unbehandelten Hermaphroditen um einen altersassoziierten Phänotyp, der etwa ab dem fünften Tag nach dem L4 Stadium einsetzt. Nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln können in den drei verwendeten *C. elegans* Stämmen zwei BOW Populationen unterschieden werden: eine altersassoziierte Population ab dem fünften Tag und eine verfrüht auftretende, Silica-Nanopartikel induzierte Population mit Maximum am dritten Tag nach dem L4 Stadium. Generell stellt der BOW-Phänotyp eine Ausprägung dar, die sich ergibt, wenn die Eiablage nicht möglich oder gestört ist, die Nachkommen sich aber normal entwickeln. Ursachen können dabei einerseits Entwicklungsfehler des Eiablage-Apparats und andererseits eine Störung der neuromuskulären Funktion sein. Weil der BOW-Phänotyp durch die Silica-Nanopartikelbehandlung ab dem adulten Stadium auch induziert wird (Abb. 4.10, C), können Entwicklungsfehler für den Silica-Nanopartikel induzierten BOW-Phänotyp ausgeschlossen werden. Entsprechend kann nur eine eingeschränkte neuromuskuläre Funktion für die erhöhte BOW Inzidenz verantwortlich sein. Um zu untersuchen, ob durch Silica-Nanopartikel induzierte degenerative Prozesse in den relevanten Bestandteilen des Eiablageapparats, also den Vulvamuskeln und den HSN Motoneuronen, für die Induktion des BOW-Phänotyps verantwortlich sind, wurde deren Morphologie analysiert. Hierzu wurden Reporterstämme eingesetzt. Wie aus den Ergebnissen hervor geht (4.6 und 4.7), ergeben sich keine morphologischen Unterschiede aufgrund der Silica-Nanopartikelbehandlung. Die HSN Motoneuronen von Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen unterschieden sich nicht in der

Lokalisation des mCherry::RAB-3 Fusionsproteins . Ihr Soma ist nicht verkleinert. Die Länge des Axons, gemessen vom Soma bis zum lokalen Neuropil, liegt bei unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen bei etwa 30 μm (Abb. 4.13, B). Je HSN-Fortsatz sind im Mittel drei Varikositäten erkennbar (Abb. 4.13, D). Diese Anzahl wurde bereits in einer anderen Studie beschrieben (Tanis et al. 2008). Insgesamt lassen sich in den HSN Motoneuronen Silica-Nanopartikel behandelte Hermaphroditen auch keine degenerativen morphologischen Veränderungen feststellen, wie sie für die dopaminergen Neuronen CEP nach Behandlung mit 6-Hydroxydopamin beschrieben wurden (Cao et al. 2005). In Hermaphroditen, die eindeutig den BOW-Phänotyp zeigten, ergeben sich, ausgehend von der Lokalisation des mCherry::RAB-3 Fusionsproteins im Soma und an den Synapsen, keine erkennbaren Silica-Nanopartikel induzierten morphologischen Unterschiede (Abb. 4.14). In der vorliegenden Arbeit sind demnach morphologische Veränderungen in den HSN Motoneuronen von Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen nicht feststellbar. Die morphologische Untersuchung der Vulvamuskeln von adulten Hermaphroditen hat keine Silica-Nanopartikel induzierte Veränderung ergeben (Abb. 4.15). Auffällig ist jedoch, dass bei Hermaphroditen mit eindeutigem BOW-Phänotyp die Sarkomerintegrität der Vulvamuskeln verändert ist. Dies zeigt sich auch an den verkürzten Myosinfilamenten im Vergleich zu adulten Tieren. Weil beim BOW-Phänotyp die geschlüpften Larven Veränderungen in der Gewebeintegrität hervorrufen können, die Hermaphroditen jedoch nach dem Kriterium der innerlich geschlüpften Nachkommenschaft als BOW-Phänotypen selektiert werden, lässt sich aus dem Ergebnis nicht ableiten, ob die beobachteten Muskelveränderungen die Ursache oder die Folge der eingeschränkten Eiablage-Funktion sind. Weshalb die Vulvamuskeln möglicherweise von den Aktivitäten der innerlich geschlüpften Larven betroffen sind, während die HSN Neuronen offenbar keine Veränderung zeigen, könnte eventuell durch die Basal-Lamina erklärt werden, die die Muskeln von den Neuronen und der Hypodermis trennt. Da die muskeldegenerativen Veränderungen in BOW-Phänotypen in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Tieren zu beobachten sind, handelt es sich eindeutig nicht um einen spezifischen, Silica-

Nanopartikel induzierten Effekt. Insoweit konnte in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten morphologischen Studien kein Anhaltspunkt gefunden werden, der den Silica-Nanopartikel induzierten Effekt der Störung des Eiablage-Verhaltens erklären konnte. Um zu überprüfen, ob in Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen bereits am dritten Tag nach dem L4 Stadium die Eiablage-Funktion gestört ist, und es dadurch zu Erhöhung der BOW Inzidenz kommt, wurde ein Eiablage-Test durchgeführt. Beim *C. elegans* Hermaphroditen kann die Eiablage-Funktionalität auf zwei Arten untersucht werden: In einer Methode wird angenommen, dass die Gonade gleichbleibend Eier produziert, die in den Uterus gelangen. Enthält der Uterus mehr Eier als üblich, dann muss das an einer eingeschränkten Eiablage-Funktionalität liegen. Bei der zweiten Methode wird eine ungestörte Entwicklung der Nachkommen angenommen. Werden Eier eines späteren Entwicklungsstadiums abgelegt als üblich, dann entspricht das einer längeren Verweildauer im Uterus und damit einer eingeschränkten Eiablage-Funktionalität. Weil aus den bisherigen Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit klar hervorgeht, dass nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln die Nachkommenproduktion reduziert ist, die Larvalentwicklung jedoch nicht gestört wird, kann nur die zweitgenannte Methode eine Auskunft über die Eiablage-Funktionalität geben. Das Ergebnis dieses Tests zeigt, dass mit Silica-Nanopartikeln behandelte Hermaphroditen Eier eines späteren Entwicklungsstadiums ablegen (Abb. 4.17). Daraus folgt, dass Silica-Nanopartikel die Funktion des Eiablage-Apparats stören. Damit ist es wahrscheinlich, dass der beobachtete mit Silica-Nanopartikeln induzierte Effekt auf die Eiablage nicht auf einer degenerativen, morphologischen Veränderung des Eiablage-Apparats beruht, sondern vielmehr auf einer Störung dessen Funktion. Diese Annahme wird durch das Ergebnis unterstützt, dass die Wiederherstellung des Silica-Nanopartikel induzierten Effekts auf die Eiablage-Funktion untersuchen sollte (Abb. 4.11). Dabei wurde Ethosuximid eingesetzt, um zu überprüfen ob der Silica-Nanopartikel induzierte Effekt auf die Eiablage rückgängig gemacht werden kann. Für Ethosuximid wurde bereits gezeigt, dass es die Eiablage Funktion in wt Hermaphroditen stimulieren kann (Evason et al. 2005), während *egl-1* Mutanten, bei denen aufgrund eines Entwicklungsfehlers die HSN Motorneuronen fehlen (Trent et

al. 1983), nicht auf die Behandlung mit Ethosuximid ansprechen. Damit ergibt sich, dass Ethosuximid präsynaptisch auf die HSN Neuronen wirkt (Evason et al. 2005). Bei gleichzeitiger Behandlung von wt Hermaphroditen mit Silica-Nanopartikeln und 4 mg/ml Ethosuximid konnte der Anteil von BOW-Phänotypen von 33,3% in Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen auf 5,5% signifikant reduziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die intrinsische Funktion der Vulvamuskeln bei der Behandlung mit Silica-Nanopartikeln erhalten bleibt, die HSN Funktion wahrscheinlich aber inhibiert ist. Eine inhibierte HSN Funktion könnte eventuell auch die erhöhte BOW Inzidenz im wyls97 Stamm erklären. Der Stamm exprimiert ein mCherry::RAB-3 Fusionsprotein das mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist. Möglicherweise stört das exogene Fusionsprotein den Vesikelverkehr bei der synaptischen Übertragung und damit die HSN Funktion. Zusammenfassend betrachtet führt die Behandlung mit Silica-Nanopartikeln bei *C. elegans* Hermaphroditen zu einer erhöhten BOW Inzidenz, die zum Teil früher einsetzt und auf einer eingeschränkten neuromuskulären Funktion, höchstwahrscheinlich seitens der HSN, beruht.

Die neuromuskuläre Funktion des Eiablage-Apparats nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln könnte weiter charakterisiert werden, wenn Hermaphroditen benutzt würden, die Mutationen in den für die Funktion der Neuronen und Muskeln relevanten Signalwegen aufweisen. Ein weiterer Ansatz wäre die Untersuchung der Funktion der HSN Motorneuronen anhand des Serotoninhaushalts. So ist bekannt, dass die Eiablage-defiziente Mutante *egl-30* einen geringeren Gehalt an Serotonin in den HSN Neuronen aufweist als wt Hermaphroditen (Tanis et al. 2007).

5.6 Nano-Bio-Interaktionen von Silica-Nanopartikeln

In Partikelfällungsexperimenten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Silica-Partikel zelluläre Proteine adsorbieren. Vorhergehende Arbeiten der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass Silica-Nanopartikel in den Zellkern gelangen und dort abberante Proteinaggregate auslösen, die den neuronalen intranukleären Einschlüssen bei der Huntington'schen Krankheit gleichen (Chen und von Mikecz 2005; Chen et al. 2008). Proteine die im Zellkern der behandelten Zellen mit diesen Proteinaggregaten kolokalisierten, wurden *in vitro* von den Silica-Nanopartikeln adsorbiert. Die mit Silica-Nanopartikeln behandelten Zellen wiesen Merkmale replikativer Seneszenz auf (Chen und von Mikecz 2005). In *Caenorhabditis elegans* Hermaphroditen konnten floreszenzmarkierte Silica-Nanopartikel im Darm nachgewiesen werden. Ein akuter toxischer Effekt von Silica-Nanopartikeln auf die Lebensspanne der Nematoden war nicht feststellbar. Silica-Nanopartikel führten in Hermaphroditen aber zu reproduktiver Seneszenz. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Silica-Nanopartikel das Eiablage-Verhalten stören, indem sie die neuromuskuläre Funktion des Eiablage-Apparates inhibieren. Dies lässt sich in einer signifikanten Zunahme der BOW Inzidenz nach Behandlung mit Silica-Nanopartikeln erkennen. Weil gezeigt werden konnte, dass Silica-Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 500 nm nicht zu einer erhöhten Inzidenz des BOW-Phänotypen führen (Pluskota et al. 2009), handelt es sich hierbei um einen spezifischen Effekt von Silica-Nanopartikeln.

Insgesamt ist erkennbar, dass Silica-Nanopartikel sich hinsichtlich ihrer biologischen Effekte auf Zellen und den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* deutlich von feinen Silica-Partikeln unterscheiden.

6 Literaturverzeichnis

Adler, Carolyn E.; Fetter, Richard D.; Bargmann, Cornelia I. (2006): UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. In: *Nat Neurosci* 9 (4), S. 511–518.

AlléAemann, E.; Gravel, P.; Leroux, J-C; Balant, L.; Gurny, R. (1997): Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: Evidence of complement C3 component involvement. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 37 (2), S. 229–234.

Altun, Z.F; Herndon, L.A; Crocker, C.; Lints, R.; Hall, D. (Hg.) (2002-2010): WormAtlas. <http://www.wormatlas.org>.

Ambros, Victor (2000): Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 10 (4), S. 428–433.

Antebi, A.; Norris, C.R; Hedgecock, E.M; Garriga, G. (1997): Cell and Growth Cone Migrations. In *C. elegans II*. Chap. 21. pp. 583-609. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Brenner, S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics* 77 (1), S. 71–94.

Brunk, UlfT; Terman, Alexei (2002): Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. In: *Free Radic Biol Med* 33 (5), S. 611–619.

Byerly, L.; Cassada, R.; Russell, R. (1976): The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans* *11. Wild-type growth and reproduction. In: *Developmental Biology* 51 (1), S. 23–33.

Campagnola, PaulJ; Millard, AndrewC; Terasaki, Mark; Hoppe, PamelaE; Malone, ChristianJ; Mohler, WilliamA (2002): Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. In: *Biophys J* 82 (1 Pt 1), S. 493–508.

Cao, Songsong; Gelwix, ChristopherC; Caldwell, KimA; Caldwell, GuyA (2005): Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. In: *J Neurosci* 25 (15), S. 3801–3812.

Cassada, R.; Russell, R. (1975): The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode. In: *Developmental Biology* 46 (2), S. 326–342.

Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H. et al. (2007): Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (7), S. 2050–2055.

- Champoux, J. J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. In: *Annu Rev Biochem* 70, S. 369–413.
- Chang, Jenq-Sheng; Chang, Ke Liang B.; Hwang, Deng-Fwu; Kong, Zwe-Ling (2007): In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. In: *Environ. Sci. Technol* 41 (6), S. 2064–2068.
- Chapleau, Richard R.; Sagermann, Martin (2009): Real-time in vivo imaging of mercury uptake in *Caenorhabditis elegans* through the foodchain. In: *Toxicology* 261 (3), S. 136–142.
- Chen, Min; Mikecz, Anna von (2005): Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. In: *Exp Cell Res* 305 (1), S. 51–62.
- Chen, Min; Singer, Lena; Scharf, Andrea; Mikecz, Anna von (2008): Nuclear polyglutamine-containing protein aggregates as active proteolytic centers. In: *J Cell Biol* 180 (4), S. 697–704.
- Chen, Ying; Chen, Jie; Dong, Jing; Jin, Yihe (2004): Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats. In: *Toxicol Ind Health* 20 (1-5), S. 21–27.
- Choi, Soo-Jin; Oh, Jae-Min; Choy, Jin-Ho (2009): Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. In: *J Inorg Biochem* 103 (3), S. 463–471.
- Cox, G. N. (1981): Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. In: *The Journal of Cell Biology* 90 (1), S. 7–17.
- Desai, Chand; Garriga, Gian; McIntire, Steven L.; Horvitz, H. Robert (1988): A genetic pathway for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons. In: *Nature* 336 (6200), S. 638–646.
- Dixon, S. J. (2005): Muscle arm development in *Caenorhabditis elegans*. In: *Development* 132 (13), S. 3079–3092.
- Duerr, J. S.; Gaskin, J.; Rand, J. B. (2001): Identified neurons in *C. elegans* coexpress vesicular transporters for acetylcholine and monoamines. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 280 (6), S. C1616-22.
- Ehrenstein, G. and Schierenberg E. (ed Zuckerman B.M.) von (1980): Cell lineages and development of *Caenorhabditis elegans* and other nematodes. Nematodes as biological models Vol I. Behavioral and developmental models. Chapter 1. pp 2-68. New York: Academic Press.
- Elder, Alison; Gelein, Robert; Silva, Vanessa; Feikert, Tessa; Opanashuk, Lisa; Carter, Janet et al. (2006): Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. In: *Environ Health Perspect* 114 (8), S. 1172–1178.

Ellis, R. and Schedl T. (2007): Sex determination in the germ line. WormBook: ed. The C. elegans Research Community.

Evason, Kimberley; Huang, Cheng; Yamben, Idella; Covey, DouglasF; Kornfeld, Kerry (2005): Anticonvulsant medications extend worm life-span. In: *Science* 307 (5707), S. 258–262.

Farrah, T.; Deutsch, E. W.; Omenn, G. S.; Campbell, D. S.; Sun, Z.; Bletz, J. A. et al. (2011): A High-Confidence Human Plasma Proteome Reference Set with Estimated Concentrations in PeptideAtlas. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (9), S. M110.006353.

Fechter, LaurenceD; Johnson, DavidL; Lynch, RobertA (2002): The relationship of particle size to olfactory nerve uptake of a non-soluble form of manganese into brain. In: *Neurotoxicology* 23 (2), S. 177–183.

Forrester, Wayne C.; Kim, Changsung; Garriga, Gian (2004): The Caenorhabditis elegans Ror RTK CAM-1 inhibits EGL-20/Wnt signaling in cell migration. In: *Genetics* 168 (4), S. 1951–1962.

Fu, Huihua; Hu, Yunhua; McNelis, Tim; Hollinger, JeffreyO (2005): A calcium phosphate-based gene delivery system. In: *J Biomed Mater Res A* 74 (1), S. 40–48.

Fubini, Bice; Hubbard, Andrea (2003): Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. In: *Free Radic. Biol. Med* 34 (12), S. 1507–1516.

Gerstbrein, Beate; Stamatias, Georgios; Kollias, Nikiforos; Driscoll, Monica (2005): In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in Caenorhabditis elegans. In: *Aging Cell* 4 (3), S. 127–137.

Ghosh, Partha S.; Kim, Chae-Kyu; Han, Gang; Forbes, Neil S.; Rotello, Vincent M. (2008): Efficient gene delivery vectors by tuning the surface charge density of amino acid-functionalized gold nanoparticles. In: *ACS Nano* 2 (11), S. 2213–2218.

Grant, B.; Hirsh, D. (1999): Receptor-mediated endocytosis in the Caenorhabditis elegans oocyte. In: *Mol Biol Cell* 10 (12), S. 4311–4326.

Greenwald, I. (1997): Development of the Vulva. In C. elegans II. (ed. D.L. Riddle et al.). Chap. 19. pp. 519-541. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Griffitts, J. S.; Whitacre, J. L.; Stevens, D. E.; Aroian, R. V. (2001): Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. In: *Science* 293 (5531), S. 860–864.

Hall, D. H.; Winfrey, V. P.; Blaeuer, G.; Hoffman, L. H.; Furuta, T.; Rose, K. L. et al. (1999): Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of Caenorhabditis elegans: relations between the germ line and soma. In: *Dev. Biol* 212 (1), S. 101–123.

Hall, David H.; Altun, Zeynep F. (2008): C. elegans atlas. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Hardaker, L. A.; Singer, E.; Kerr, R.; Zhou, G.; Schafer, W. R. (2001): Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *Caenorhabditis elegans*. In: *J. Neurobiol* 49 (4), S. 303–313.
- Hemmerich, P.; Mikecz, A. von (2000): Antinuclear autoantibodies: fluorescent highlights on structure and function in the nucleus. In: *Int Arch Allergy Immunol* 123 (1), S. 16–27.
- Hengartner, Michael O. (1997): Apoptosis and the shape of death. In: *Dev. Genet* 21 (4), S. 245–248.
- Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E. et al. (2003): Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (23), S. 13549–13554.
- Hom, C.; Lu, J.; Tamanoi, F. (2009): Silica nanoparticles as a delivery system for nucleic acid-based reagents. In: *J Mater Chem* 19 (35), S. 6308–6316.
- Horvitz, H. R.; Chalfie, M.; Trent, C.; Sulston, J. E.; Evans, P. D. (1982): Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Science* 216 (4549), S. 1012–1014.
- Hoss, S.; Arndt, M.; Baumgarte, S.; Tebbe, C. C.; Nguyen, H. T.; Jehle, J. A. (2008): Effects of transgenic corn and Cry1Ab protein on the nematode, *Caenorhabditis elegans*. In: *Ecotoxicol Environ Saf* 70 (2), S. 334–340.
- Hubbard, E. Jane Albert; Greenstein, David (2005): Introduction to the germ line. In: *WormBook*, S. 1–4.
- Hughes, StacieE; Evason, Kimberley; Xiong, Chengjie; Kornfeld, Kerry (2007): Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. In: *PLoS Genet* 3 (2), S. e25.
- IARC (1997): Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Silica, some silicates, coal dust and para-aramidfibrils. 68, S. 1–475.
- Kaluza, S.; Kleine-Balderhaar, J.; Orthen, B.; Honnert, B.; Jankowska, E.; Pietrowski, P. et al. (2006): Workplace exposure to nanoparticles.
- Kampkötter, Andreas; Nkwonkam, ChristianeGombitang; Zurawski, RubenFelix; Timpel, Claudia; Chovolou, Yvonne; Watjen, Wim; Kahl, Regine (2007): Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. In: *Toxicology* 234 (1-2), S. 113–123.
- Killian, Darrell J.; Hubbard, E. Jane Albert (2004): *C. elegans* pro-1 activity is required for soma/germline interactions that influence proliferation and differentiation in the germ line. In: *Development* 131 (6), S. 1267–1278.
- Kim, Kyuhung; Li, Chris (2004): Expression and regulation of an FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. In: *J Comp Neurol* 475 (4), S. 540–550.

- Kim, Mi-Hee; Na, Hee-Kyung; Kim, Young-Kwan; Ryoo, Soo-Ryoon; Cho, HaeSung; Lee, KyungEun et al. (2011): Facile synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles with ultralarge pores and their application in gene delivery. In: *ACS Nano* 5 (5), S. 3568–3576.
- Kimble, J.; Hirsh, D. (1979): The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. In: *Dev Biol* 70 (2), S. 396–417.
- Koelle, Michael R.; Horvitz, H. Robert (1996): EGL-10 Regulates G Protein Signaling in the *C. elegans* Nervous System and Shares a Conserved Domain with Many Mammalian Proteins. In: *Genetics* (84), S. 115–125.
- Kumar, Sandeep; Aninat, Caroline; Michaux, Grégoire; Morel, Fabrice (2010): Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. In: *Reproductive Toxicology* 29 (4), S. 415–420.
- Labouesse, Michel (2006): Epithelial junctions and attachments. In: *WormBook*.
- Lee, K. P.; Kelly, D. P. (1992): The pulmonary response and clearance of Ludox colloidal silica after a 4-week inhalation exposure in rats. In: *Fundam Appl Toxicol* 19 (3), S. 399–410.
- Lehane, M. J. (1997): PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. In: *Annu. Rev. Entomol* 42 (1), S. 525–550.
- L'Hernault, S. W. (1997): Spermatogenesis. In *C. elegans II.* (ed. D. L. Riddle et al.). chap. 11. pp. 417-500. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- L'Hernault, S.W (2006): Spermatogenesis. In: *WormBook*.
- Li, X. Y.; Brown, D.; Smith, S.; MacNee, W.; Donaldson, K. (1999): Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. In: *Inhal Toxicol* 11 (8), S. 709–731.
- Liao, VivianHsiu-Chuan; Yu, Chan-Wei; Chu, Yu-Ju; Li, Wen-Hsuan; Hsieh, Yi-Chen; Wang, Teng-Ting (2011): Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. In: *Mech Ageing Dev* 132 (10), S. 480–487.
- Lundqvist, Martin; Sethson, Ingmar; Jonsson, Bengt-Harald (2004): Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. In: *Langmuir* 20 (24), S. 10639–10647.
- Mayr, W.; Bosch, A.; Heinemann, M.; Hendrickx, B.; Maier, M.; Nordone, A. et al. (2006): Synthetic Amorphous Silica (CAS No.7631-86-9)ECETOC JACC No 51. In: *ECETOC Joint Assessment of Commodity Chemicals*.
- McCarter, J.; Bartlett, B.; Dang, T.; Schedl, T. (1997): Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages. In: *Dev Biol* 181 (2), S. 121–143.

- McCarter, J.; Bartlett, B.; Dang, T.; Schedl, T. (1999): On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. In: *Dev Biol* 205 (1), S. 111–128.
- Melkman, Tali; Sengupta, Piali (2004): The worm's sense of smell. Development of functional diversity in the chemosensory system of *Caenorhabditis elegans*. In: *Dev Biol* 265 (2), S. 302–319.
- Merget, R.; Bauer, T.; Küpper, H. U.; Philippou, S.; Bauer, H. D.; Breitstadt, R.; Bruening, T. (2002): Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. In: *Arch. Toxicol* 75 (11-12), S. 625–634.
- Mikecz, Anna von (2009): PolyQ fibrillation in the cell nucleus: who's bad? In: *Trends Cell Biol* 19 (12), S. 685–691.
- Miller, M. A. Nguyen V.Q. Lee M.H. Kosinski M. Schedl T. Caprioli R.M and Greenstein D. (2001): A Sperm Cytoskeletal Protein That Signals Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation. In: *Science* 291 (5511), S. 2144–2147.
- Moghimi, SMoein; Hunter, AChristy; Murray, JClifford (2005): Nanomedicine: current status and future prospects. In: *FASEB J* 19 (3), S. 311–330.
- Mornet, Stéphane; Lambert, Olivier; Duguet, Etienne; Brisson, Alain (2005): The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. In: *Nano Lett* 5 (2), S. 281–285.
- Nabeshi, H.; Yoshikawa, T.; Matsuyama, K.; Nakazato, Y.; Arimori, A.; Isobe, M. et al. (2010): Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. In: *Pharmazie* 65 (3), S. 199–201.
- Napierska, Dorota; Thomassen, LeenCJ; Lison, Dominique; Martens, JohanA; Hoet, PeterH (2010): The nanosilica hazard: another variable entity. In: *Part Fibre Toxicol* 7 (1), S. 39.
- Nathoo, A. N.; Moeller, R. A.; Westlund, B. A.; Hart, A. C. (2001): Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditiselegans* and other species. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98 (24), S. 14000–14005.
- Nel, Andre E.; Mädler, Lutz; Velegol, Darrell; Xia, Tian; Hoek, Eric M. V.; Somasundaran, Ponisseril et al. (2009): Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. In: *Nat Mater* 8 (7), S. 543–557.
- Nelson, F. Kenneth; Riddle, Donald L. (1984): Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. In: *J. Exp. Zool* 231 (1), S. 45–56.
- Nemmar, Abderrahim; Hoylaerts, MarcF; Hoet, PeterHM; Vermylen, Jozef; Nemery, Benoit (2003): Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 186 (1), S. 38–45.
- Newman, A. P.; White, J. G.; Sternberg, P. W. (1996): Morphogenesis of the *C. elegans* hermaphrodite uterus. In: *Development* 122 (11), S. 3617–3626.

- Nishimori, Hikaru; Kondoh, Masuo; Isoda, Katsuhiro; Tsunoda, Shin-Ichi; Tsutsumi, Yasuo; Yagi, Kiyohito (2009): Silica nanoparticles as hepatotoxicants. In: *Eur J Pharm Biopharm* 72 (3), S. 496–501.
- Patel, M. R.; Shen, K. (2009): RSY-1 Is a Local Inhibitor of Presynaptic Assembly in *C. elegans*. In: *Science* 323 (5920), S. 1500–1503.
- Pietsch, Kerstin; Saul, Nadine; Menzel, Ralph; Sturzenbaum, StephenR; Steinberg, ChristianEW (2009): Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. In: *Biogerontology* 10 (5), S. 565–578.
- Pluskota, Adam; Horzowski, Eva; Bossinger, Olaf; Mikecz, Anna von (2009): In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence. In: *PLoS ONE* 4 (8), S. e6622.
- Roiter, Yuri; Ornatska, Maryna; Rammohan, AravindR; Balakrishnan, Jitendra; Heine, DavidR; Minko, Sergiy (2009): Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces. In: *Langmuir* 25 (11), S. 6287–6299.
- Rosemary, M. J.; MacLaren, Ian; Pradeep, T. (2006): Investigations of the antibacterial properties of ciprofloxacin@SiO₂. In: *Langmuir* 22 (24), S. 10125–10129.
- Sambrock, Joseph; Fritsch, E. F.; Maniatis (1989): 1. Molecular cloning: A laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawin ER. (1996): Genetic and cellular analysis of modulated behaviors in *Caenorhabditis elegans*. PhD thesis. MIT, Cambridge, MA, USA.
- Schafer, William R. (2006): Genetics of Egg-Laying in Worms. In: *Annu. Rev. Genet* 40 (1), S. 487–509.
- Schierenberg, Einhard (2006): Embryological variation during nematode development. In: *WormBook*, S. 1–13.
- Schinkmann, K.; Li, C. (1992): Localization of FMRFamide-like peptides in *Caenorhabditis elegans*. In: *J. Comp. Neurol* 316 (2), S. 251–260.
- Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. In: *J Cell Comp Physiol* 59, S. 223–239.
- Sisodia, S. S. (1998): Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? In: *Cell* 95 (1), S. 1–4.
- Slowing, IgorI; Vivero-Escoto, JuanL; Wu, Chia-Wen; Lin, VictorS-Y (2008): Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. In: *Adv Drug Deliv Rev* 60 (11), S. 1278–1288.
- So, Soo Jeong; Jang, Ik Soon; Han, Chong Soo (2008): Effect of micro/nano silica particle feeding for mice. In: *J Nanosci Nanotechnol* 8 (10), S. 5367–5371.

- Sternberg, Paul W. (2005): Vulval development. In: *WormBook*.
- Stöber, W.; Fink, W.; Bohn, E. (1968): Controlled growth of monodisperse silicaspheres in the micron size range. In: *J Colloid Interface Sci* 26:62-69. 1968 (26), S. 62–69.
- Stretton, A. O. (1976): Anatomy and development of the somatic musculature of the nematode *Ascaris*. In: *J Exp Biol* 64 (3), S. 773–788.
- Sulston, J. E.; Horvitz, H. R. (1977): Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. In: *Dev Biol* 56 (1), S. 110–156.
- Sulston, J. E.; Schierenberg, E.; White, J. G.; Thomson, J. N. (1983): The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Dev. Biol* 100 (1), S. 64–119.
- Tanis, JessicaE; Moresco, JamesJ; Lindquist, RobertA; Koelle, MichaelR (2008): Regulation of serotonin biosynthesis by the G proteins Galphao and Galphaq controls serotonin signaling in *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics* 178 (1), S. 157–169.
- Tenzer, Stefan; Docter, Dominic; Rosfa, Susanne; Wlodarski, Alexandra; Kuharev, Jörg; Reikik, Alexander et al. (2011): Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona: A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis. In: *ACS Nano*, S. 110825141338099.
- Trent, C.; Tsuing, N.; Horvitz, H. R. (1983): Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics* 104 (4), S. 619–647.
- Vanblaaderen, A.; Kentgens, A. (1992): Particle morphology and chemical microstructure of colloidal silica spheres made from alkoxysilanes. In: *Journal of Non-Crystalline Solids* 149 (3), S. 161–178.
- Vertegel, AlexeyA; Siegel, RichardW; Dordick, JonathanS (2004): Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. In: *Langmuir* 20 (16), S. 6800–6807.
- Vijayanathan, Veena; Thomas, Thresia; Thomas, T. J. (2002): DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. In: *Biochemistry* 41 (48), S. 14085–14094.
- Vitums, V. C.; Edwards, M. J.; Niles, N. R.; Borman, J. O.; Lowry, R. D. (1977): Pulmonary fibrosis from amorphous silica dust, a product of silica vapor. In: *Arch. Environ. Health* 32 (2), S. 62–68.
- Waggoner, L. E.; Hardaker, L. A.; Golik, S.; Schafer, W. R. (2000): Effect of a neuropeptide gene on behavioral states in *Caenorhabditis elegans* egg-laying. In: *Genetics* 154 (3), S. 1181–1192.
- Waggoner, L. E.; Zhou, G. T.; Schafer, R. W.; Schafer, W. R. (1998): Control of alternative behavioral states by serotonin in *Caenorhabditis elegans*. In: *Neuron* 21 (1), S. 203–214.

- Wang, Huanhua; Wick, Robert L.; Xing, Baoshan (2009): Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Environ Pollut* 157 (4), S. 1171–1177.
- Ward, S.; Thomson, N.; White, J. G.; Brenner, S. (1975): Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *J Comp Neurol* 160 (3), S. 313–337.
- White, J. (1988): The Anatomy. In *The nematode C. elegans*. (ed. W.B. Wood) pp81-122. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- White, J.G; Southgate, E.; Thomson, J.N; Brenner, S. (1986): The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. In: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Series B. Biol. Sci.* 314: 1-340 314, S. 1–340.
- Wood, W.B (1988a): Embryology. In *The nematode C. elegans*. Chapter 8. pp 215-241. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wood, W.B (1988b): Introduction to *C. elegans* biology. In *The nematode C. elegans*. (ed. W.B. Wood). Chapter 1. pp 1-16. . Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yang, Xifei; Liu, Jianjun; He, Haowei; Zhou, Li; Gong, Chunmei; Wang, Xiaomei et al. (2010): SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. In: *Part Fibre Toxicol* 7, S. 1.
- Yu, Kyung O.; Grabinski, Christin M.; Schrand, Amanda M.; Murdock, Richard C.; Wang, Wei; Gu, Baohua et al. (2009): Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. In: *J Nanopart Res* 11 (1), S. 15–24.
- Zhang, Mi; Chung, Samuel H; Fang-Yen, Chris; Craig, Caroline; Kerr, Rex A; Suzuki, Hiroshi et al. (2008): A self-regulating feed-forward circuit controlling *C. elegans* egg-laying behavior. In: *Curr Biol* 18 (19), S. 1445–1455.
- Zhang, Qunwei; Kusaka, Yukinori; Zhu, Xinqiang; Sato, Kazuhiro; Mo, Yiqun; Kluz, Thomas; Donaldson, Kenneth (2003): Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. In: *J Occup Health* 45 (1), S. 23–30.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	mirko, 10 ⁻⁶
20S	20S Proteasom
APS	Ammoniumpersulfat
BAM	N-tert-Butylacrylamid (engl. N-tert-butylacrylamide)
BOW	(engl. bag-of-worms)
CEP	Cephalische Neuronen
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
DAPI	4',6-Diaminidino-2-phenylindol
DL	dorsal-links
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleicacid)
DR	dorsal-rechts
DTC	distale Spitzen-Zelle (engl. distal tip cell)
DTT	Dithiotreitol
ECL	verstärkte (engl. enhanced) Chemilumineszenz
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm; [g]
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
H ₄ SiO ₄	Orthokieselsäure

Anhang

HCAI	(engl. <u>h</u> uman <u>c</u> arbonic <u>a</u> nhydase I)
HP1 γ	gamma-Isoform von Heterochromatin Protein I
HSN	Hermaphroditen spezifisches Neuron
HSNL	Hermaphroditen spezifisches Neuron, links
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ig	Immunglobulin
In	Gesamtlysat (engl. input)
k	kilo, 10^3
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton; [10^3 *g/mol]
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter; [l]
LB	Luria-Bertani
LBR	Lamin-B-Rezeptor
M	Mega, 10^6
M	Molarität; [mol/l]
m	mili, 10^{-3}
m	Meter [m]
MAP	(engl. mitogen-activated protein)
Mbp	Mega Basenpaare, 10^6 Basenpaare
MDa	Mega Dalton; [10^6 g/mol]
min	Minute
MSP	haupt Spermien Protein (engl. Major sperm protein)
n	nano, 10^{-9}
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ O•nSiO ₂ ; n=2-4	Natriumsilikat
NaCl	Natriumchlorid

NGM	Nematodenmedium (engl. nematode growth medium)
NIPAM	N-Isopropylacrylamid (engl. N-isopropylacrylamide)
P	Pellet
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCNA	(engl. <u>p</u> roliferating <u>c</u> ell <u>n</u> uclear <u>a</u> ntigen)
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly-L-Lysin
PLML	posteriorer Mechanosensor, links (engl. posterior lateral microtubule cells)
PML	Promyelocytische-Leukämie-Oncoprotein
RIP	Ring/Pharynx Interneuron
ROI	Analysebereich (engl. region of interest)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium (engl. Sodium) Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Si(OC ₂ H ₅) ₄	Tetraethylorthosilikat
SiCl ₄	Siliciumtetrachlorid
SiO ₂	Siliciumdioxid
SK-N-SH	humane Neuroblastomazelllinie
SLB	(engl. supported lipid bilayer)
snRNP	kleiner nukleärer Ribonukleoproteinpartikel (engl. small nuclear ribonucleoproteinparticle)
t	Tonne; [10 ⁶ g]
TBP	TATAbox-bindendes Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Topo I	Topoisomerase I
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat

Anhang

U1-70k	(engl. U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa)
Üb	Überstand
unm.	unmarkiert
VCn n=1-4	Hermaphroditen spezifische Neurone am Ventralstrang (engl. ventral cord)
VL	ventral-links
vm(n) n=1-2	Vulvamuskeln
VPC	Vulvavorläuferzelle (engl. vulval procurser cell)
VR	ventral-rechts
WB	Western Blot
wt	wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22 °C.....	12
Abbildung 1.2 Anatomie der Eiablage-Neuromuskulatur	21
Abbildung 4.1 Silica-Partikel komplexieren mit Topoisomerase I	46
Abbildung 4.2 Silica-Partikel komplexieren mit Topoisomerase I bereits nach 5 Minuten.....	47
Abbildung 4.3 Bildung von Partikel-Protein-Komplexen in Abhängigkeit zur Konzentration der Silica- Partikel.	48
Abbildung 4.4 Abhängigkeit der Zusammensetzung der Proteincorona von der Größe der Silica- Partikel	49
Abbildung 4.5 Silica-Partikel präzipitieren Proteine aus Lysat von <i>C. elegans</i>	51
Abbildung 4.6 Aufnahme von Silica-Nanopartikeln durch <i>Caenorhabditis elegans</i>	52
Abbildung 4.7 Kaplan-Meier Überlebenskurve von unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen.....	53
Abbildung 4.8 Akkumulation von Lipofuscin in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen.....	55
Abbildung 4.9 Silica-Nanopartikel induzieren eine Reduktion der Nachkommenproduktion und eine Erhöhung der BOW Inzidenz	57
Abbildung 4.10 Die Behandlung mit Silica-Nanopartikeln nach Abschluss der Entwicklung reduziert die Nachkommenproduktion und induziert den BOW-Phänotyp	59
Abbildung 4.11 Der Silica-Nanopartikel induzierte Effekt auf die Nachkommenproduktion und den BOW-Phänotyp wird durch Ethosuximid wiederhergestellt	61
Abbildung 4.12 Zeitlicher Verlauf der Inzidenz von BOW	63
Abbildung 4.13 Morphologie von HSN Motorneuronen in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten adulten Hermaphroditen.....	66
Abbildung 4.14 Morphologie von HSNL in Hermaphroditen mit BOW-Phänotyp	67
Abbildung 4.15 Morphologie der Vulvamuskeln in unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen.....	68
Abbildung 4.16 Quantifizierung der nicht abgelegten Eier im Verlauf der Behandlung mit Silica- Nanopartikeln	69
Abbildung 4.17 Entwicklungsstadien der abgelegten Eier von unbehandelten und Silica-Nanopartikel behandelten Hermaphroditen.....	70

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Dipl.-Biol. Adam Pluskota

Geburtsdatum:	08. April 1980
Geburtsort:	Posen (Polen)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

01/1988 – 07/1991	Grundschule (Wilhelmschule), Kamp-Lintfort
08/1991 – 05/2000	Städtisches Gymnasium Kamp-Lintfort Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

09/2000 – 06/2001	Grundwehrdienst als Sanitätssoldat bei der Luftwaffenanitätsstaffel/LwUBtl Kalkar
-------------------	--

Hochschulbildung

10/2001 – 06/2006	Studiengang Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/2003	Vordiplom Biologie
06/2006	Diplom Biologie
07/2006 – 11/2011	Promotion am Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Anna von Mikecz für die gute wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Bei Herrn Prof. Hermann Aberle aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Prof. Olaf Bossinger und Eva Horzowski danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Einweisung in die Arbeiten mit dem "Wurm" *Caenorhabditis elegans*.

Bei der Geschäftsleitung des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung, Herrn Prof. Jean Krutmann und Dr. Alexander Beaucamp, sowie Herrn Dr. Marc Majora bedanke ich mich besonders.

Vielen Dank an die Mitarbeiter und auch an ehemalige Mitarbeiter des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Freundin Lena für die Unterstützung, den Rückhalt, die nötige Abwechslung vom Laboralltag und das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorgelegte Dissertation von mir eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst wurde. Die Dissertation wurde in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Adam Pluskota

Teile der Dissertation sind in PloS ONE 2009 veröffentlicht.
(PloS ONE 4(8):e6622. doi:10.1371/journal.pone.0006622)