

# **Einfluss von kolloidalen Silikananopartikeln auf die EGFR- abhängige Signaltransduktion**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Alexander Kümper**

aus Köln

Düsseldorf, Mai 2017

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

Referent: Dr. rer. nat. **Klaus Unfried**  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. **Henrike Heise**  
Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.17

Die Wege zur Erkenntnis sind interessanter als die Erkenntnis selbst.

*Gottfried Wilhelm Leibniz (1646-1716)*

## Zusammenfassung in deutscher Sprache

Moderne Nanomaterialien nehmen eine immer größere Bedeutung in industriell gefertigten Produkten ein. Der Mensch kommt deshalb über verschiedene Expositionswege, die z.T. auch den medizinischen Einsatz von Nanopartikeln in diagnostischen oder therapeutischen Anwendungen beinhalten, in Kontakt. Die Interaktion von Nanomaterialien mit biologischen Systemen des menschlichen Körpers wird von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Partikel bestimmt. Die Art der Interaktion mit einzelnen Körperzellen bzw. deren Bestandteilen entscheidet, ob positive oder negative Effekte auf die Gesundheit des Menschen entstehen.

In dieser Arbeit wurden kolloidale Silikananopartikel, die aus Tetraethylorthosilicat nach der Synthese von Hartlen (2008) hergestellt wurden, auf ihre Fähigkeit untersucht, mit den Signaltransduktionswegen epithelialer Zellen zu interagieren. Im Versuchssystem mit Rattenlungenepithelzellen (RLE 6TN) wurden drei verschiedene Größen kolloidaler Silikananopartikel (Si15 – 15 nm; Si25 – 25 nm; Si80 – 80 nm) untersucht und mit Kontrollnanopartikeln verglichen. Zusätzlich zur Zytotoxizität der Partikel wurden vor allem Effekte auf die Zellproliferation und Signaltransduktion betrachtet. Neben den molekularen Mechanismen der Partikeleffekte wurden insbesondere die Aufnahmemechanismen der Silikananopartikel und die subzelluläre Lokalisation der Partikel in den Zellen untersucht.

Die kleinsten verwendeten Silikapartikel (Si15) zeigten einen bislang nicht beschriebenen inhibitorischen Effekt auf die durch den epidermalen Wachstumsfaktor- (EGF-)vermittelte Zellproliferation. Dieser Effekt war nicht durch die Induktion von Zelltod auf der Ebene von Apoptose oder Nekrose begründet. Vielmehr zeigte sich eine spezifische Interaktion von Silikananopartikeln mit der EGFR-abhängigen proliferativen Signaltransduktion. Si15 Nanopartikel führten zu einer Reduktion der Phosphorylierung des EGFRs am Tyrosinrest 1173. Die mit der Aktivierung des Rezeptors einhergehende Internalisierung und die Aktivierung von intrazellulären Signalkinasen, insbesondere Proteinkinase B (Akt), wurden durch die Nanopartikel signifikant verringert. Die molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung der Nanopartikel wurden auf der Ebene der Interaktion mit dem natürlichen Liganden EGF identifiziert. So konnte in zellfreien Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem EGF gezeigt werden, dass dieser an Silikananopartikel bindet. Konfokalmikroskopische Untersuchungen zeigten im zellulären System eine Kolokalisation der Partikel und EGF in vesikulären Strukturen. Weitere Analysen mit den Endozytose-

Inhibitoren Chlorpromazin und Filipin III haben gezeigt, dass die Silikananopartikel (SiNP) in Abwesenheit von EGF Clathrin-abhängig von den Zellen internalisiert werden. Durch Färbungen mit vesikulären Markern wurden die SiNP in frühen und späten Endosomen lokalisiert, sodass von einem Transport der Partikel zu den Lysosomen ausgegangen werden kann.

## **Zusammenfassung in englischer Sprache**

Modern nanomaterial is becoming increasingly important in industrially manufactured products. The human being therefore comes across various routes of exposure, including the medical use of nanoparticles in diagnostic or therapeutic applications. The interaction of nanomaterial with biological systems of the human body is determined by the physicochemical properties of the particles. This type of interaction with individual body cells determines whether positive or negative effects for human health are elicited.

In this work, colloidal silica nanoparticles prepared from tetraethylorthosilicate by the Hartlen synthesis (2008) were tested for their ability to interact with the signal transduction pathways of epithelial cells. In the experimental system with rat epithelial cells (RLE 6TN), three different sizes of silica nanoparticles (Si15 - 15 nm, Si25 - 25 nm, Si80 - 80 nm) were investigated and compared with control nanoparticles. In addition to cytotoxicity, the effects of the particles on cell proliferation and signal transduction were considered. The molecular mechanisms of the particle effects as well as the uptake mechanisms of the silica nanoparticles and subcellular localization of the particles were investigated.

The smallest silica particles (Si15) exhibited an inhibitory effect on the epidermal growth factor (EGF-) mediated cell proliferation. This effect was not caused by the induction of cell death at the level of apoptosis or necrosis. Rather, a specific interaction of silica nanoparticles with EGFR-dependent proliferative signal transduction was demonstrated. Exposure to Si15 nanoparticles resulted in a reduction of EGFR phosphorylation at tyrosine residue 1173. The nanoparticles significantly reduced EGFR internalization and the activation of intracellular signal kinases, particularly protein kinase B (Akt), which are associated with the activation of the receptor. The molecular mechanisms of the anti-proliferative effect of the nanoparticles were identified at the level of interaction with the natural ligand EGF. This was shown in cell-free investigations with fluorescence-tagged EGF that it binds to silica nanoparticles. Confocal microscopy showed a colocalization of the particles and EGF in vesicular structures in the cellular system. Further analyses with the endocytosis inhibitors chlorpromazine and filipin III showed that the silica nanoparticles were internalized in the absence of EGF employing clathrin-dependent mechanisms. Using fluorescent markers for sub-cellular vesicles, silica nanoparticles localized in early and late endosomes. Thus, it was concluded that silica nanoparticles after internalization are transported to the lysosomes.

## Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
®	<i>engl.</i> registered trademark (eingetragenes Warenzeichen)
™	<i>engl.</i> trademark (nicht registriertes Warenzeichen)
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>engl.</i> analysis of variance (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CA	Zelluloseacetat
ca.	circa
cCbl	<i>engl.</i> casitas B-lineage lymphoma
CNP	Kohlenstoff-Nanopartikel
COPD	<i>engl.</i> Chronic obstructive pulmonary disease
Ctrl	Negativkontrolle (H <sub>2</sub> O)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
DLS	<i>engl.</i> dynamic light scattering (dynamische Lichtstreuung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalz-Lösung)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>engl.</i> epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>engl.</i> epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	<i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay (Antikörper-basiertes Nachweisverfahren)
<i>engl.</i>	englisch
Erk 1/2	<i>engl.</i> extrazellular-signal regulated kinase 1 and 2
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ( <i>lat.</i> und Andere)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>engl.</i> Fluorescence activated cell sorter (Handelsname einer speziellen Form der Durchflusszytometrie)
FCS	<i>engl.</i> fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FSC	<i>engl.</i> forward scatter
g	Gravitation
ggf.	gegebenenfalls
Grb2	<i>engl.</i> growth factor receptor-bound protein 2
HBSS +/-	<i>Hank's Buffered Saline Solution</i> +Ca /+Mg (gepufferte Kochsalz-Lösung mit Kalzium und Magnesium)

H <sub>2</sub> O (d <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	Milli-Q-Wasser (Reinstwasser)
H <sub>2</sub> DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
HRP	<i>engl.</i> horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IRS1	<i>engl.</i> insulin receptor substrate 1
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Jnk 1/2	<i>engl.</i> c-Jun N-terminal kinases
M	Molarität
MAPK	<i>engl.</i> Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP-Kinasen-Kinasen
MRI	<i>engl.</i> magnetic resonance imaging
mTOR	<i>engl.</i> mechanistic target of Rapamycin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimid-Ester
NP	Nanopartikel
NR	Neutralrot
nor.	normiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	Polyzyklische Kohlenwasserstoffe
PDK1	<i>engl.</i> 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PES	Polyethersulfon
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	<i>engl.</i> phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	<i>engl.</i> phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	<i>engl.</i> phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphateg
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QD	<i>engl.</i> quantum dots
Raf	<i>engl.</i> rat fibrosarcoma
Ras	<i>engl.</i> rat sarcoma
rel.	relativ
RIPA	<i>engl.</i> radioimmuno precipitation
RLE-Zellen	Rattenlungenepithel-Zellen (RLE6-TN)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>engl.</i> revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHC	<i>engl.</i> src-homology 2 domain containing
SI	<i>frz.</i> Système international d'unités (Internationales Einheitensystem)
SiF	<i>engl.</i> fumed Silica (pyrogenes Siliziumdioxid)
SiNP	kolloidale Silikananopartikel
sog.	sogenannt
SOS	<i>engl.</i> son of sevenless
SSC	<i>engl.</i> side scatter



STED	<i>engl.</i> stimulated emission depletion
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEOS	Tetraethylorthosilikat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurate
Tyr	Tyrosin
V	Volt
WST-1	<i>engl.</i> watersoluble tetrazolium salt (Wasserlösliches Tetrazoliumsalz)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Ziegennormalserum

Alle anderen verwendeten Abkürzungen von Chemikalien und Einheiten entsprechen der IUPAC bzw. der SI-Nomenklatur.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung in deutscher Sprache .....	IV
Zusammenfassung in englischer Sprache .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Nanopartikel – physikalische/chemische Eigenschaften.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Exposition von Menschen gegenüber Nanopartikeln.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Zell-Partikel-Interaktionen .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Kohlenstoffnanopartikel .....	8
1.3.2 Silikananopartikel .....	10
<b>1.4 Die Protein-Tyrosin-Kinase EGFR.....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Aktivierung des EGFRs.....	13
1.4.2 Internalisierung und Deaktivierung des EGFRs .....	14
1.4.3 EGFR-abhängige Signalwege über Erk 1/2 und Akt.....	16
<b>1.5 Zielsetzung dieser Dissertation.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Nanopartikel .....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Kolloidale Siliziumdioxidnanopartikel (SiNP) .....	20
2.1.2 Fumed Silikapartikel (SiF) .....	23
2.1.3 Ultrafeine Kohlenstoffnanopartikel ‚Carbon Black‘ (CNP).....	23
<b>2.2 Zelllinie RLE-6TN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Liste der verwendeten Geräte .....	25
2.3.2 Liste der Verbrauchsmaterialien.....	27
2.3.3 Liste der verwendeten Chemikalien .....	28
2.3.4 Antikörper und Färbungen.....	30
2.3.5 Verwendete Software .....	31
<b>2.4 Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.4.1 Charakterisierung der SiNP .....	32
2.4.2 Charakterisierung der SiNP in Anwesenheit von EGF .....	33
<b>2.5 Zellkultur.....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Exposition von RLE-Zellen gegenüber Nanopartikeln .....	35
<b>2.6 Zytotoxizitätsassays .....</b>	<b>36</b>
2.6.1 Wst-1-Assay .....	36

2.6.2	Neutralrot-Assay .....	37
<b>2.7</b>	<b>Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies.....</b>	<b>38</b>
2.7.1	Zellfreier DCF-Assay .....	38
2.7.2	Zellbasierter DCF-Assay .....	39
<b>2.8</b>	<b>Apoptose/Nekrose Assay .....</b>	<b>39</b>
<b>2.9</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>41</b>
2.9.1	Zelllyse und Proteinextraktion.....	41
2.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
2.9.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	42
2.9.4	Western Blot Transfer .....	43
2.9.5	Immunologische Proteinnachweise durch Chemilumineszenz .....	44
2.9.6	Belastungs-Szenarien für Proteinnachweise (EGFR, Erk, Akt).....	45
<b>2.10</b>	<b>Quantitative Analyse von Erk 1/2 und Akt (Cellomics ArrayScan™).....</b>	<b>45</b>
<b>2.11</b>	<b>Proliferationsassay mit Trypanblau .....</b>	<b>46</b>
<b>2.12</b>	<b>Translokation des EGFRs.....</b>	<b>46</b>
<b>2.13</b>	<b>Konfokales Laser-Raster-Mikroskop ‚Leica TCS SP5‘ .....</b>	<b>48</b>
2.13.1	Funktionsprinzip .....	48
2.13.2	Bildaufnahme am ‚Leica TCS SP 5‘ .....	49
2.13.3	Erstellung von Zell-Präparaten .....	50
2.13.4	Einbett-Medium Mowiol .....	51
<b>2.14</b>	<b>EGF und SiNP im zellulären System.....</b>	<b>52</b>
2.14.1	Markierung von EGF mittels Fluoreszenzfarbstoff.....	52
2.14.2	Interaktion zwischen EGF und SiNP (Gelelektrophorese).....	52
2.14.3	Interaktion zwischen EGF und SiNP (Fluoreszenz-Färbung) .....	54
2.14.4	Interaktion zwischen dem EGFR und SiNP .....	54
<b>2.15</b>	<b>Aufnahme von Silikananopartikel in RLE-Zellen .....</b>	<b>55</b>
2.15.1	Aufnahmemechanismus.....	55
2.15.2	Frühe Endosomen .....	56
2.15.3	Späte Endosomen .....	56
2.15.4	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SiNP auf RLE-Zellen.....	56
<b>2.16</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>58</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Zytotoxizität .....</b>	<b>59</b>
3.1.1	Neutralrot Assay .....	59
3.1.2	WST-1 Assay.....	62

3.1.3	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies .....	64
<b>3.2</b>	<b>Proliferationsassay .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3</b>	<b>Apoptose/Nekrose Assay .....</b>	<b>71</b>
<b>3.4</b>	<b>Phosphorylierung des EGFR (Western Blot).....</b>	<b>73</b>
<b>3.5</b>	<b>Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt .....</b>	<b>75</b>
3.5.1	Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt (Western Blot).....	76
3.5.2	Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt nach 5 min und 3,5 h .....	81
<b>3.6</b>	<b>Translokation des EGFRs.....</b>	<b>87</b>
<b>3.7</b>	<b>Markierung von EGF mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto488.....</b>	<b>90</b>
3.7.1	Charakterisierung der SiNP in Anwesenheit von EGF .....	91
3.7.2	Berechnungen zu den Verhältnissen zwischen SiNP und EGF .....	95
<b>3.8</b>	<b>Darstellung der Interaktion von EGF und SiNP mittels Gelelektrophorese .....</b>	<b>96</b>
<b>3.9</b>	<b>Mikroskopische Analysen (Konfokale Laser Raster Mikroskopie).....</b>	<b>101</b>
3.9.1	Kolokalisation von Nanopartikeln und dem EGFR.....	101
3.9.2	Kolokalisation von Nanopartikeln und EGF .....	103
3.9.3	Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln .....	106
3.9.4	Silikananopartikel in frühen Endosomen (EEA1-Färbung) .....	111
3.9.5	Silikananopartikel in späten Endosomen (Rab7-Färbung).....	113
3.9.6	Verteilungsdichte der SiNP auf der Membran von RLE-Zellen .....	115
<b>4. Diskussion .....</b>		<b>117</b>
<b>4.1</b>	<b>Zytotoxizität .....</b>	<b>118</b>
<b>4.2</b>	<b>Reaktive Sauerstoffspezies.....</b>	<b>121</b>
<b>4.3</b>	<b>Proliferation .....</b>	<b>123</b>
<b>4.4</b>	<b>EGFR-abhängige Signaltransduktion .....</b>	<b>126</b>
<b>4.5</b>	<b>EGF-EGFR-Partikel Interaktionen.....</b>	<b>131</b>
<b>4.6</b>	<b>Aufnahmemechanismus von kolloidalen SiNP in RLE-Zellen.....</b>	<b>134</b>
<b>4.7</b>	<b>Lokalisation von kolloidalen SiNP in RLE-Zellen .....</b>	<b>136</b>
<b>4.8</b>	<b>Verteilungsdichte der SiNP auf der Membran von RLE-Zellen.....</b>	<b>137</b>
<b>4.9</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>139</b>
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>		<b>143</b>
<b>6. Anhang .....</b>		<b>169</b>
<b>6.1</b>	<b>Aufführung aller verwendeten Partikelchargen.....</b>	<b>169</b>
6.1.1	Me-Serie .....	169
6.1.2	Fd-Serie .....	170

<b>6.2</b>	<b>Kolokalisation von SiNP und EGFR (Einzelbilder der Bilderstapel).....</b>	<b>171</b>
<b>6.3</b>	<b>Aktin EGFR Interaktion.....</b>	<b>172</b>
<b>6.4</b>	<b>Frühe Endosomen (EEA1 Einzelbilder der Bilderstapel) .....</b>	<b>173</b>
<b>6.5</b>	<b>Rab7-Färbung: Detektion von SiNP in späten Endosomen (Zeitreihe) .....</b>	<b>175</b>
	Danksagung .....	177
	Curriculum Vitae .....	178
	Erklärung an Eides statt.....	180

# 1. Einleitung

## 1.1 Nanopartikel – physikalische/chemische Eigenschaften

Das Präfix Nano- leitet sich von dem griechischen Wort *nānos* (*νᾶνος*) ab und bedeutet Zwerg oder zwerghaft. Partikel in diesem Maßstab bestehen aus wenigen bis mehreren tausend Molekülen (Jena und Castleman, 2010) und können zum Beispiel luftgetragen, in einer Flüssigkeit oder in einer Matrix eingebunden vorkommen. Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften, wie zum Beispiel Superparamagnetismus oder optischen Eigenschaften, sind Nanopartikel bei industriellen und technologischen Anwendungen besonders wertvoll. Andere Nanopartikel zeichnen sich durch ihre Fähigkeit, als Elektronendonatoren bei der Energiespeicherung zu fungieren, aus (He *et al.*, 2013). Leitfähige Nanomaterialien können zur Herstellung transparenter schaltbarer Oberflächen für Displays vieler technischer Geräte und Verbraucherprodukten eingesetzt werden (Goebbert *et al.*, 1999). Außerdem werden Nanopartikel bei medizinischen Anwendungen wie zur Diagnose von Krankheiten oder zum Medikamententransport eingesetzt.

Laut einer allgemeinen Empfehlung der Europäischen Union aus dem Jahr 2011 gehören Materialien zur Gruppe der Nanomaterialien, wenn sie (i) einen Durchmesser zwischen 1 nm und 100 nm in einer oder mehreren Dimensionen haben, (ii) aus Gemischen (Agglomerate und Aggregate) mit unterschiedlicher Größenverteilung bestehen, bei denen min. 50% der Partikel eine Größe zwischen 1 nm und 100 nm haben, (iii) aus Partikelgemischen bestehen, bei denen die spezifische volumenbezogene Oberfläche des Materials größer als  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  beträgt (European Commission, 2011). In besonderen Fällen, bei denen ein Risiko für Mensch und Umwelt gegeben ist, sollen auch Gemische bei denen 1 - 50% der Partikel 1 – 100 nm betragen bzw. die spezifische volumenbezogene Oberfläche unter  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  liegt als Nanomaterialien klassifiziert werden. Nach der Isonorm CEN ISO/TS 27687 werden neben sphärischen Partikeln auch Fasern (*engl.* tubes, fibers), stäbchenförmige Materialien (*engl.* rods) und vieleckige Partikel (z.B. *engl.* octahedral particles), sowie Kohlenstoffnanoröhrchen (*engl.* carbon nanotubes), Fullerene und Nanoplättchen zu den Nanomaterialien gezählt, auch wenn ihre Größe kleiner oder größer als 1 - 100 nm in einer oder mehreren Dimensionen ist. Nanomaterialien können neben erwünschten Wirkungen aber auch toxische Effekte beim Menschen auslösen, die durch gröbere Partikel desselben Materials bei gleicher Masse deutlich schwächer oder gar nicht ausgelöst werden (Oberdörster *et al.*, 2007). Nanotoxikologische Studien zielen darauf ab, solche toxischen Wirkungen und ihre

Mechanismen, die spezifisch für Nanomaterialien sind, zu erfassen und so potentielle Risiken für den Menschen zu identifizieren und Gefahren durch die Exposition gegenüber diesen Materialien zu bewerten.

Bei gleicher Masse besitzen Nanopartikel eine größere reaktive Oberfläche im Vergleich zu größeren Partikeln. Eine raue oder poröse Beschaffenheit der Oberfläche von Nanopartikeln kann die reaktive Oberfläche zusätzlich vergrößern (Edwards *et al.*, 1997; Hoover *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2006), während sich die reaktive Oberfläche des Materials durch Aggregation oder Agglomeration von Nanopartikeln verkleinert (Jiang *et al.*, 2009; Limbach *et al.*, 2005). Weil eine Wirkung von Nanopartikeln auf biologische Systeme über ihre reaktive Oberfläche vermittelt wird, ist dieser Parameter für die Effektstärke von Partikelwirkungen ausschlaggebend.

Aufgrund ihrer Entstehung können Nanopartikel in drei Kategorien eingeteilt werden. Die eine Kategorie beinhaltet Partikel, die durch natürliche Umstände wie Erosion, Brände oder Vulkanausbrüche oder durch biogene Faktoren wie zum Beispiel von Bakterien gebildet, entstanden sind (Jogler *et al.*, 2011). Die zweite Kategorie sind Partikel, die durch den Menschen unabsichtlich erzeugt werden. Den größten Anteil dieser anthropogenen Nanopartikel wird bei Verbrennungsprozessen, wie etwa durch Industrieemissionen, Hausbränden und Individualverkehr, erzeugt (Europäische Union, 2004). Die dritte Kategorie stellen industriell erzeugte Nanomaterialien mit spezifischen technologischen Anwendungen dar. Die zwei wichtigsten Herangehensweisen, um Nanopartikel technisch herzustellen, sind die top-down und die bottom-up Methode. Zum Beispiel können Nanopartikel aus größeren Materialstücken auf mechanischem Weg mithilfe von Lasertechnik herausgelöst, mit Mahlwerken erzeugt oder nasschemisch in wässrigem Milieu abgeschieden werden (top-down Methode; Cornacchio *et al.*, 2005; Sylvestre *et al.*, 2004). Alternativ können Partikel durch Flammen-Spray-Pyrolyse aufgebaut oder aus Vorstufen wie zum Beispiel Estern oder Salzen synthetisiert werden (bottom-up Methode; Mueller *et al.*, 2003; Spicer *et al.*, 1998; Turkevich *et al.*, 1951; Frens, 1972 und 1973). Bei allen Herstellungsmethoden hat man die Möglichkeit, die Größe der Nanopartikel gezielt zu steuern (Canelas *et al.*, 2009; Hartlen *et al.*, 2008; Stöber 1968).

Für die physikalisch/chemischen Eigenschaften eines Partikels ist in erster Linie die chemische Zusammensetzung des Materials verantwortlich. Nanopartikel können aus einer Vielzahl von Materialien oder Werkstoffen bestehen bzw. synthetisiert werden. Zum Beispiel

besteht ein Großteil superparamagnetischer Nanopartikel, die in der Therapie von Gehirntumoren zum Einsatz kommen, aus Eisenoxid (Kikumori *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010) und Silbrenanopartikel werden aufgrund ihrer antiseptischen Wirkung in medizinischen Produkten und in Textilien eingesetzt, da die sich an der Oberfläche abscheidenden Silberionen das Wachstum von Bakterien einschränken (Pal *et al.*, 2007; Sambhy *et al.*, 2006). Die materialspezifischen Eigenschaften von Nanopartikeln wurden in diversen Übersichtsartikeln zusammengetragen (Auffan *et al.*, 2009; Nel *et al.*, 2009). Generell unterscheidet man zwischen metallischen (Silber, Gold), oxidischen (Siliziumdioxid, Titandioxid), kohlenstoff- und polymerhaltigen Partikeln (Chen *et al.*, 2007; Hartlen, 2008; Niemeyer *et al.*, 2001, Rao und Geckeler, 2011). Es existieren auch dotierte Materialien, Legierungen oder Gemische von Materialien. Jedoch gerade im Falle der Core Shell (*engl.* Kern-Hülle-) Partikel handelt es sich nicht um eine Materialmischung, sondern der Kern und die Hülle des Partikels bestehen aus unterschiedlichen Material-Phasen (Lu *et al.*, 2002). Während die Zusammensetzung synthetisierter Partikel, je nach Qualität der Ausgangsstoffe, bestimmt werden kann, enthalten verbrennungsgenerierte Umweltpartikel in der Regel anorganische Verunreinigungen wie Metalle und/oder organische Verunreinigungen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), die auf der Oberfläche der Partikel adsorbieren (Jenkins *et al.*, 1996; Keyser *et al.*, 1978).

Modifikationen auf der Oberfläche von Nanopartikeln können deren physikalische und chemische Eigenschaften verändern. Zum Beispiel können Nanopartikel während der Synthese durch fluoreszierende Farbstoffe im Kern oder an ihrer Oberfläche markiert werden und so als Sonden für mikroskopische Analysen genutzt werden (Schübbe *et al.*, 2010 und 2012). Alternativ oder zusätzlich können die Nanopartikel nach der Synthese an ihrer Oberfläche für bestimmte Anwendungen funktionalisiert werden (Bagwe *et al.*, 2006; Subbiah *et al.*, 2010), sodass zum Beispiel die Ladung der Partikel vorherbestimmt werden kann oder die Partikel mit reaktiven Seitengruppen versehen werden können. Durch gezielte Funktionalisierung kann zum Beispiel eine Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen verbessert werden (Lunov *et al.*, 2011) oder wasserunlösliche Partikel hydrophil gemacht werden, sodass sie in wässriger Lösung eine monodisperse Suspension ergeben (De Palma *et al.*, 2007; Tasis *et al.*, 2003). Hydrophile Partikel bilden in wässriger Umgebung eine Hydrathülle aus, indem sich Wassermoleküle durch Dipol-Ionen-Wechselwirkungen um einen Partikel anordnen. Dadurch werden Partikel in einer Lösung stabilisiert und Wechselwirkungen zwischen Partikeln, die zu einer Agglomeration von Partikeln führen können, minimiert. Die Stabilität von solchen kolloidalen Nanopartikelsuspensionen ist auch von dem umgebenden



Lösungsmittel und den darin gelösten Substanzen abhängig. Änderungen des pH-Werts oder die Anwesenheit von Proteinen in biologischen Systemen können das Agglomerationsverhalten sowie eine gewünschte Wirkungsweise von Partikeln beeinflussen (Elzey und Grassian, 2010; Gebauer *et al.*, 2012). Die Moleküle, die sich auf der Oberfläche eines Partikels befinden, bestimmen auch die Ladung dieses Partikels, welche für eine schädliche Wirkung von Partikeln ausschlaggebend sein kann (Barker *et al.*, 2013). Zum Beispiel ist bei Silikananopartikeln die Ladung der Partikel durch die Silanol-Gruppen auf der Oberfläche vorgegeben, kann aber durch Modifikationen verändert werden (Chung *et al.*, 2007). Bei kolloidalen Nanopartikelsuspensionen können diese zum Beispiel elektrostatisch über die Ladung stabilisiert werden, welche empfindlich gegenüber Salzen und Änderungen des pH-Werts ist. Durch elektrostatische Kräfte kann daher ein Agglomerieren von Partikeln verhindert werden. Alternativ können monodisperse Partikel durch ungeladene Makromoleküle auf ihrer Oberfläche sterisch stabilisiert werden.

## **1.2 Exposition von Menschen gegenüber Nanopartikeln**

Der Mensch kommt in erster Linie mit anthropogenen Nanopartikeln aus Verbrennungsprozessen in Kontakt. Neben Industrieemissionen tragen hier vor allem Hausbrände und Individualverkehr zur Entstehung von Aerosolen mit Umweltnanopartikeln bei. Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass die Exposition des Menschen gegenüber dieser ultrafeinen Fraktion der Umweltstäube mit einer Vielzahl von Erkrankungen des Menschen korreliert (Donaldson *et al.*, 2005; Harrison und Yin, 2000; Jaspers *et al.*, 1995; Oberdörster *et al.*, 2000 und 2007).

Umweltnanopartikel kommen zunächst mit den epithelialen Grenzgeweben des menschlichen Körpers in Kontakt. Die Haut bietet im gesunden Zustand eine gute Barriere gegen eine Penetration von Nanopartikeln (Borm *et al.*, 2006). Untersuchungen mit Modellnanopartikeln konnten jedoch zeigen, dass (z.B. durch UV-Licht) geschädigte Haut diesen Schutz nicht mehr bietet und Nanopartikel in tiefere Hautschichten, wie die Dermis, eindringen können (Mortensen *et al.*, 2008). Über den Gastrointestinaltrakt aufgenommene Nanopartikel sind in der Lage, mit Epithelien zu interagieren und Reaktionen auszulösen, die möglicherweise zur Entstehung von Erkrankungen beitragen (Gerloff *et al.*, 2013). Über die Lunge wird der größte Anteil von Nanopartikeln aufgenommen, weil die meisten Umweltnanopartikel in der

Atemluft enthalten sind. Studien haben gezeigt, dass die Größe der Partikel der ausschlaggebende Faktor ist, in welche Teile der Lunge sie deponieren. Partikel mit einem Durchmesser von 1 nm, wie mikroskalierte Partikel, gelangen hauptsächlich in Regionen des Nasenrachenraums. Besonders Nanopartikel im Größenbereich 10 – 100 nm gelangen bis in die Alveolen (Oberdörster *et al.*, 2005). Dort interagieren Nanopartikel mit Entzündungszellen und alveolaren Epithelzellen. Makrophagen sind in der Lage, Nanopartikel entweder durch Transport in die Bronchien der mukoziliären Reinigung zuzuführen oder über das lymphatische System aus den Atemwegen zu entfernen. Die Interaktion mit epithelialen Zellen kann zu pro-inflammatorischen Reaktionen führen. Aufgrund ihrer geringen Größe können Nanopartikel Epithelien durchdringen und sich so systematisch im Körper verteilen (Lunov *et al.*, 2011; Unfried *et al.*, 2009). Über den Blutkreislauf können sie sekundäre Organe erreichen und ggf. dort akkumulieren (Chaves *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2008). Es gibt Hinweise, dass so aufgenommene Nanopartikel sogar in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Arvizo *et al.*, 2010).

Bei medizinischen Anwendungen von Nanopartikeln werden diese gezielt dem Körper verabreicht und zum Beispiel als Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie (Matthew *et al.*, 2009), in der Krebsdiagnostik (Medley *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2007) oder als Medikamententransporter eingesetzt (Slowing *et al.*, 2008). Dabei nutzt man die Aufnahme- und Verteilungsmechanismen der Nanopartikel im Körper aus, um die Partikel an den Zielort zu bringen (z.B. Enhanced permeability and retention effect; Alexiou *et al.*, 2011). Bei der gezielten Verabreichung von Nanopartikeln kommen diese zuerst mit epithelialen oder endothelialen Grenzgeweben bzw. deren Immunzellen in Kontakt. Eine inhalative Aufnahme von Nanopartikeln über die Lunge, dem Hauptaufnahmeweg von Umweltpartikeln, ist auch bei medizinischen Anwendungen möglich. Diese Methode wird jedoch nur verwendet, um z.B. stark hydrophobe Nanopartikel zu applizieren, die nicht über eine orale Gabe aufgenommen werden (Yang *et al.*, 2008) oder im Magen hydrolytisch bzw. enzymatisch abgebaut würden (Mohanraj und Chen, 2006). Bei einer oralen Gabe werden Partikel über die Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts aufgenommen (Florence *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2000). Je nach Anwendung können Nanopartikel auch intravenös injiziert werden, sodass sie sich im Körper verteilen oder direkt am Wirkungsort appliziert werden (Schröder und Sabel, 1996). Die meisten dieser Partikel werden als Kontrastmittel verwendet (Hainfeld *et al.*, 2014) oder dazu eingesetzt um Medikamente zu verabreichen, indem ein Wirkstoff in ihrem Kern eingeschlossen oder auf ihrer Oberfläche gebunden wird (Müller *et al.*, 2000). Die

Nanopartikel fungieren dabei als Transporter für Wirkstoffe, die ohne Nanopartikel nicht an den Zielort gelangen würden (Wijaya *et al.*, 2009).

### 1.3 Zell-Partikel-Interaktionen

Neben der reaktiven Oberfläche stellt die primäre Partikelgröße einen entscheidenden physikalischen Parameter für spezifische Reaktionen von Nanopartikeln dar, die bei größeren Partikeln nicht auftreten (Oberdörster, 2007; Stoeger, 2006). Die Größe nimmt maßgeblich Einfluss, ob und über welche Mechanismen Nanopartikel in Zellen eindringen können. In der Literatur wurden Mechanismen, wie Makropinozytose, Clathrin- bzw. Caveolin-abhängige Endozytose und Clathrin- bzw. Caveolin-unabhängige Endozytose beschrieben (Conner und Schmid, 2003b; Hao *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2002; Iversen *et al.*, 2011). Die physikalischen/chemischen Parameter eines Partikels, wie die Komposition des Materials und die damit einhergehende reaktive Oberfläche, die Form, die Ladung oder die Größe der Partikel beeinflussen die Aufnahmeeffizienz von Partikeln in Zellen (Cho *et al.*, 2009; Rauch *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2005). Untersuchungen zur Internalisierung von Nanopartikeln und Mikropartikeln in Epithelzellen haben ergeben, dass Nanopartikel im Vergleich zu Mikropartikeln vermehrt von Zellen aufgenommen werden und bis in Organellen wie den Mitochondrien oder den Zellkern transportiert werden (Desai *et al.*, 1996; Foley *et al.*, 2002; Schübbe *et al.*, 2012). Während diesem Vorgang können die Nanopartikel die Funktion von Organellen stören und zum Beispiel Mitochondrien-abhängige Apoptose auslösen sowie oxidative DNA-Schäden im Nukleus induzieren (Sharma *et al.*, 2012; Thongkam *et al.*, 2016). Es konnte auch gezeigt werden, dass Nanopartikel zelluläre Stressantworten dem endoplasmatischen Retikulum (ER) auslösen, was Auswirkungen auf die Genregulation hat und letztendlich Apoptose induziert (Chen *et al.*, 2014). In den meisten Studien wurden Nanopartikel innerhalb der Zellen in Endosomen oder in Lysosomen nachgewiesen, weil sie als direkte Folge der endozytotischen Aufnahme dorthin transportiert wurden. In den Lysosomen, die einen geringeren pH-Wert als andere Organellen der Zelle haben (Iversen *et al.*, 2011), können die Nanopartikel zellulär degeneriert oder deponiert werden. Partikel, wie Polystyrolnanopartikel und Quantum Dots (QD), wurden auch in nicht verdauenden und nicht lysosomalen Vesikeln detektiert (Lai *et al.*, 2007; Tekle *et al.*, 2008). Einzelne internalisierte Nanopartikel können auch über exozytotische Vorgänge aus Zellen wieder heraus transportiert werden (Oh und Park, 2014).

Unabhängig vom Aufnahmemechanismus stellt die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einen zentralen Wirkmechanismus von Nanopartikeln dar, bei dem zum Beispiel Membranschäden verursacht, biochemische Signalprozesse beeinflusst, das Wachstumsverhalten von Zellen gestört, Entzündungsreaktionen gesteuert oder Apoptose ausgelöst werden kann (Akhtar *et al.*, 2012; Gojova *et al.*, 2007; Sydlik *et al.*, 2006). Die Entstehung von intrazellulärem oxidativem Stress durch Nanopartikel kann über verschiedene Mechanismen erklärt werden (Unfried *et al.* 2007). Nanopartikel aus Übergangsmetallen können zu Redox-Prozessen im Rahmen von Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion beitragen (Aust *et al.* 1985). Weiterhin hat man beobachtet, dass in biologischen Systemen aufgrund der großen katalytisch wirksamen Oberfläche auch nicht metallische Nanopartikel, wie Kohlenstoffnanopartikel ein intrinsisches oxidatives Potential haben (Weissenberg *et al.*, 2010). Weiterhin können Nanopartikel sekundär über bislang unbekannte molekulare Mechanismen zur Aktivierung oxidativer Systeme wie NADPH-Oxidasen und Xanthin-Oxidasen beitragen (Vlasova *et al.*, 2016). Die Anwesenheit von Partikel-induzierten ROS hat zur Folge, dass sich das elektrische Potential der Membran durch die Ladung der Nanopartikel ändert und die Struktur der Membran über Lipid-Peroxidation zerstört werden kann (Karlssona *et al.*, 2013). Eine weitere Folge ist die Oxidation von Proteinen oder anderen Makromolekülen (Auffan *et al.*, 2009). Internalisierte Partikel können auch intrazellulär ROS generieren und die physiologischen Prozesse von Organellen wie den Mitochondrien (Pan *et al.*, 2009) oder dem ER beeinflussen. Silbernanopartikel können zum Beispiel über ROS-induzierte Aktivierung des Jnk-Signalwegs im ER zelluläre Stressantworten oder mitochondriale Apoptose induzieren (Huo *et al.*, 2015; Piao *et al.*, 2011). De la Fuente und Berry (2005) konnten zeigen, dass Nanopartikel bis in den Nukleus transportiert werden und ROS-induzierte oxidative DNA-Schäden verursachen (Sharma *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2011). Ebenso können Partikel einen indirekten Einfluss auf die Genexpression von Zellen nehmen. Zum Beispiel konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass Goldnanopartikel in einem bisher ungeklärten Mechanismus in der Leber und der Niere von Ratten Gene aktivieren, die in Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus stehen (Balasubramanian *et al.*, 2010). Generell zeigt sich in der Literatur die Tendenz, dass hydrophobe (schwer dispergierbare) Partikel eine schädlichere Wirkung als hydrophile (kolloidale) Partikel haben.

Nanopartikel, die *in vitro* oder *in vivo* Kontakt mit biologischen Systemen haben, sind extrazellulären Proteinen ausgesetzt, bevor sie auf eine Zelle treffen (Lynch *et Dawson*, 2008; Monopoli *et al.*, 2011). In der Lunge sind zum Beispiel Partikel, die bis in die Alveolen

transportiert werden, dem Surfactant (*engl.* surface active agent) ausgesetzt. Die Proteine können auf der Partikeloberfläche binden, sodass sich eine Korona um die Partikel bildet und die Funktion der Proteine gestört werden kann (Lundquist *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Zhao und Douglas, 2002). Diese Korona unterliegt in biologischen Flüssigkeiten dynamischen Veränderungen, bis sie sich in einem Gleichgewicht stabilisiert (Casals *et al.*, 2010; Cedervall *et al.*, 2007; Tenzer *et al.*, 2013). Welche Proteine mit Partikeln in Wechselwirkungen stehen, hängt von der Partikelgröße und den Eigenschaften der Partikeloberfläche, wie zum Beispiel der Ladung oder einer Funktionalisierung, ab (Salvati *et al.*, 2013; Shannahan *et al.*, 2013; Lundquist *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass manche Proteine reversibel oder irreversibel an Nanopartikel binden und eine sogenannte weiche oder eine harte Korona entsteht (Milani *et al.*, 2012). Für die Interaktion von Partikeln mit Zellen und deren Internalisierung in Zellen spielt die Proteinkorona eine entscheidende Rolle (Lesniak *et al.*, 2010; Walkey *et al.*, 2014). Die Stabilität von Nanopartikeln in dispersen Suspensionen kann durch die Zugabe von Proteinen und der Ausbildung einer Korona negativ oder positiv beeinflusst werden. Durch eine sterische Abstoßung der Proteine können Nanopartikel stabilisiert werden, jedoch konnte auch ein erhöhtes Agglomerationsverhalten von kolloidalen Suspensionen in Anwesenheit von Proteinen gezeigt werden (Gebauer *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 2010).

### **1.3.1 Kohlenstoffnanopartikel**

Die Gruppe der Kohlenstoffnanopartikel sind gut untersuchte Materialien. Einerseits werden sie als Modellpartikel für verbrennungsgenerierte Umweltpartikel betrachtet und andererseits stellen sie typische hydrophobe und in Wasser schwer dispergierbare Nanopartikel aus chemisch inertem Kohlenstoff dar. Kohlenstoffnanopartikel werden auch in verschiedenen Alltagsprodukten eingesetzt. Bei der Herstellung von Autoreifen besteht ein großer Anteil des Füllstoffs in der Gummimischung aus granulären Kohlenstoffpartikeln, sog. carbon black (Aranda *et al.*, 2007). ‚Carbon Nanotubes‘ werden in Superkondensatoren verbaut (Baughman *et al.*, 2002), und ‚Fullerene‘ werden in der Produktion von Solarzellen verwendet (Fostiropoulos *et al.*, 2003). Sowohl für Umweltpartikel als auch für technologisch hergestellte Kohlenstoffnanopartikel ließen sich Zusammenhänge zwischen der Inhalation dieser Fremdstoffe und der Entstehung von Erkrankungen, wie zum Beispiel der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD; *engl.* chronic obstructive pulmonary disease),

Lungenkrebs, Mesotheliome oder kardiovaskuläre Erkrankungen nachweisen (MacNee und Donaldson, 2003; Donaldson *et al.*, 2005; Hildebrandt *et al.*, 2009).

Verbrennungsgenerierte Kohlenstoffpartikel bestehen aus ungeordneten Kohlenstoffstrukturen mit einem gewissen Grad an graphitischer Nahordnung und sind im nicht modifizierten Zustand in wässriger Umgebung nur schwer dispergierbar (Donaldson, 1999; Jäckel *et al.*, 2014; Schins und Knaapen; 2007). Besonders hydrophobe Kohlenstoffnanoröhrchen und hydrophobe Carbon Black Partikel neigen wegen ihrer ähnlichen chemischen Oberfläche in wässriger Umgebung zur Bildung von Aggregaten und Agglomeraten (Jiang *et al.*, 2009), welche die reaktive Oberfläche der Partikel verkleinern (Klüppel *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffpartikel in biologischen Systemen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren (Dick *et al.*, 2003; Weissenberg *et al.*, 2010). Diese Partikel-induzierten ROS haben schädliche Effekte auf Zellen wie zum Beispiel die Peroxidation der Membran, negative Genregulierung von adhäsiven Proteinen und erhöhter Zelltod durch Apoptose und Nekrose (Panessa-Warren *et al.*, 2006). Sydlik *et al.* (2006) und Unfried *et al.* (2007 und 2008) haben gezeigt, dass hydrophobe Kohlenstoffnanopartikel (Printex 90) bei einer Flächendosis von 10 µg/cm<sup>2</sup> bzw. einer Konzentration von 33 µg/ml intrazellulär oxidativen Stress auslösen. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des EGFR (*engl.* Epidermal Growth Factor Receptor) und seiner nachgeschalteten Signalwege. Das resultiert in einer biphasischen Aktivierung der MAP-Kinasen Erk 1/2 und einer Stimulation der Zellteilung (Peuschel *et al.*, 2010). Mechanistische Studien haben gezeigt, dass die Partikel-induzierten ROS eine Akkumulation von Ceramiden in Lipid-Raft Strukturen der Membran verursachen, die ursächlich für die genannten Signaltransduktionsereignisse ist (Peuschel *et al.*, 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass es nach Aktivierung der EGFRs und des β1-Integrin-Rezeptors durch Kohlenstoffnanopartikel zu einer PI3K-vermittelten Aktivierung von Akt kommt. Die Phosphorylierung von Akt bewirkt dann eine Aktivierung von Erk 1/2 und einem proliferativen Verhalten von Lungenepithelzellen (Unfried *et al.*, 2007). Abhängig vom Adhäsionsgrad der Epithelzellen kann die Aktivierung des EGFRs durch Kohlenstoffnanopartikel jedoch auch zur Aktivierung eines anderen MAP-Kinase-Signalwegs über Jnk 1/2 (*engl.* c-Jun N-terminal kinases) kommen, der in der spezifischen Induktion von Apoptose resultiert (Sydlik *et al.* 2006). Neben Induktion der pathogenen Endpunkte Apoptose und Proliferation ist die spezifisch durch Carbon Black Partikel ausgelöste Signaltransduktion an der Entstehung von Entzündungsreaktionen durch die Aufregulation und Ausschüttung des Interleukin 8 (IL8) im Lungenepithel verantwortlich (Brown *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2007; Sydlik *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Silikananopartikel

Silikananopartikel sind, ebenfalls wie Kohlenstoffnanopartikel, in der Literatur intensiv untersuchte Materialien und zum Teil als Bestandteil des Zusatzstoffes E551 in Lebensmitteln zugelassen. Bei dem Material Silika handelt es sich um das Dioxid von Silizium mit der Bruttoformel  $\text{SiO}_2$ . Abhängig von der Struktur des Siliziumdioxids unterscheidet man zwischen kristallinem und amorphem Silika (Napierska *et al.*, 2010). Kristallines Silika besteht aus sich translatorisch und periodisch wiederholenden Einheiten, deren Fernordnung im gesamten Material gleich ist. Ein Beispiel für kristallines Silika ist das auf der Erde am zweithäufigsten vorkommende Mineral  $\alpha$ -Quarz, welches für die Herstellung von amorphem Glas verwendet wird. Dabei werden dem kristallinen Quarz während der Schmelze Stoffe zugemischt, die eine erneute Ausbildung der Kristallstruktur beim Abkühlen verhindern (Henderson, 1985). Die Nahordnung von amorphem Silika ist ungeordnet. Mögliche Verfahren bei der Herstellung von amorphen Silikananopartikeln sind zum Beispiel neben pyrogener Hydrolyse von Siliziumchlorid in einer Knallgasflamme (fumed silica; Bartel *et al.*, 1996) die Synthese kolloidaler Silikapartikel durch die nasschemische Hydrolyse von Tetraethylorthosilicat (TEOS) in wässriger Lösung (Hartlen 2008, Stöber, 1968).

Silikapartikel können verschiedene toxikologisch relevante Reaktionen auslösen. Die Entstehung von einer Silikose durch die Inhalation von quarzhaltigen Feinstäuben ist auf eine chronische Entzündung der Lunge zurückzuführen (Rimal *et al.*, 2005). Vergleichsstudien zwischen kristallinen und amorphen Silikapartikeln haben ergeben, dass kristalline Partikel ein größeres Potential haben, Entzündungsreaktionen auszulösen und Lungentumore zu induzieren (Johnston *et al.*, 2000). Die Pathogenität der kristallinen Silikapartikel wird durch die Entstehung von oxidativem Stress an der reaktiven Oberfläche der Partikel bedingt (Lin *et al.*, 2006; Fubini *et al.*, 2003), denn in Studien mit epithelialen Rattenzellen konnten die Effekte von Quarzpartikeln durch Zugabe der antioxidativen Substanz N-acetyl Cystein reduziert werden (Ale-Agha *et al.*, 2009). Alveoläre Makrophagen (AM), die über die Lunge inhalierte Partikel aufnehmen, können die Partikel nicht abbauen, was zu einem intrazellulären Reiz durch die Partikel führt (Hamilton *et al.*, 2009). Die AM reagieren auf die Anwesenheit von kristallinen  $\text{SiO}_2$  Partikel mit einer Aufregulation und Ausschüttung des Interleukins IL-1 $\beta$  (Kawasaki, 2015), wodurch eine Entzündung induziert wird. Auch amorphe Silikananopartikel sind in der Lage, pro-inflammatorische Reaktionen auszulösen. In humanen bronchialen Zellen werden die Mediatoren IL6/IL8 aufreguliert und ausgeschüttet (Skuland *et al.*, 2014). Im Mausmodell wurde außerdem eine Hochregulation der Cytokine

IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und der Chemokine MCP-1 und MIP-2 in der bronchoalveolären Lavage nach Instillation von amorphen Silikapartikeln beobachtet, was auf eine Aktivierung des TGF- $\alpha$ -induzierten EGFR-Signalwegs durch amorphe Silikapartikel zurückzuführen ist (Cho *et al.*, 2007). In HUVEC Zellen konnte aber auch gezeigt werden, dass die über den EGFR- und PI3K-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B reduziert wird (Duan *et al.* (2014).

In toxikologischen Studien, die sich mit dem Vergleich zwischen nicht kolloidalen fumed Silikapartikeln und kolloidalen Stöberpartikeln beschäftigen, wurde ein höheres zytotoxisches Potential bzw. eine höhere Ros-Entstehung der nicht kolloidalen Partikel identifiziert (Zhang *et al.*, 2012). In einem Tierversuch mit kolloidalen Silikapartikeln konnten zwar, ähnlich wie durch nicht kolloidale Silikananopartikel, oxidative Zellschäden und eine schwache Entzündungsreaktion detektiert werden (Kaewamatawong *et al.*, 2006), allerdings erholt sich diese 30 Tage nach der Instillation der Partikel zu einem subakutem Stadium. Auch Wahrheit *et al.* (1995) konnten in Ratten zeigen, dass kolloidale Silikananopartikel im Vergleich zu kristallinen oder hydrophoben amorphen Silikapartikeln die geringsten Entzündungsreaktionen auslösen. Daher werden amorphe Silikapartikel in manchen Studien als negativ-Kontrolle für Untersuchungen an kristallinen Silikananopartikeln verwendet (Brunner *et al.*, 2006; Ghiazza *et al.*, 2010). Außerdem gibt es in der Literatur Studien, bei denen kolloidale (und mesoporöse) Silikananopartikel zu medizinischen Anwendungen im Menschen mit Medikamenten beladen werden, weil diese neben der schwachen toxischen Wirkung einfach zu synthetisieren, modifizieren und funktionalisieren sind und leicht von Zellen aufgenommen werden. Kolloidale Silikapartikel können zum Beispiel von Lungenepithelzellen über Clathrin-vermittelte und Aktin-abhängige Endozytose internalisiert werden (Chung *et al.*, 2007; Graf *et al.*, 2012; Hsiao *et al.*, 2014). Chung *et al.* (2007) hat einen Einfluss der Partikelladung für die Effizienz der Aufnahme identifiziert. Es konnte auch beobachtet werden, dass Silikananopartikel zum Beispiel über den ‚Proton Sponge‘-Effekt aus Endosomen, in denen sie sich nach Clathrin-abhängiger Aufnahme befinden, in das Zytoplasma gelangen können (Boussif *et al.*, 1995; Slowing *et al.*, 2006). Kolloidale Silikananopartikel mit einem Durchmesser von 32 nm konnten auch im Nukleus nachgewiesen werden, während 83 nm große Partikel nur in das Zytoplasma aber nicht in den Zellkern von Caco2-Zellen internalisiert werden (Schübbe *et al.*, 2012). Die gleichen kolloidalen Silikananopartikel gelangen in humanen A549 Zellen über Endozytose in die Zellen und werden über aktiven Transport in die perinukleäre Region transportiert (Schuhmann *et al.*, 2012).



Wegen der geringeren Toxizität von amorphen Silikapartikeln, im Vergleich zu kristallinem Material, gibt es eine Reihe von medizinischen Ansätzen mit Silikananopartikeln. Besonders mesoporöse Silikapartikel eignen sich gut, um medizinische Wirkstoffe, wie zum Beispiel Ibuprofen, im Körper zu transportieren und kontrolliert am Wirkungsort zu entlassen (Manzano *et al.*, 2008; Slowing *et al.*, 2007 und 2008). Funktionelle Molekülgruppen auf der Oberfläche von Partikeln verbessern die zelluläre Aufnahme und die biologische Kompatibilität, wie eine reduzierte Zytotoxizität, und ermöglichen so eine sichere intrazelluläre Abgabe von zum Beispiel DNA oder siRNA (*engl.* small interfering RNA) (Kneuer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2013). In einer *in vivo* Studie mit Mäusen wurde beobachtet, dass intravenös verabreichte lumineszierende Silikapartikel selektiv von Organen (Niere, Leber, Milz) aufgenommen werden, dort akkumulieren und innerhalb weniger Tage zu nicht toxischen Produkten (*ortho*-Kieselsäure) abgebaut werden. Wenn diese Partikel mit Dextran beschichtet wurden, konnte *in vivo* eine Akkumulation der Silikananopartikel in Tumoren der Mäuse beobachtet werden, sodass sie nicht nur als Wirkstofftransporter, sondern auch zur Identifizierung von Tumoren verwendet werden können (Park *et al.*, 2009).

#### **1.4 Die Protein-Tyrosin-Kinase EGFR**

Nanopartikel können neben einer direkten zytotoxischen Wirkung, wie zum Beispiel die Abgabe von Ionen bei Silbernanopartikeln, auch Zellreaktionen über die Generierung von oxidativem Stress auslösen. Diese ROS können Signaltransduktionsereignisse induzieren oder inhibieren, die in einer subakuten Toxizität resultieren. Für Kohlenstoffnanopartikel konnte gezeigt werden, dass der EGFR-Signalweg und nachgeschaltete Kinasen (Erk 1/2; Akt) über Partikel-induzierten oxidativen Stress aktiviert werden (Peuschel *et al.*, 2010; Sydlik *et al.*, 2006; Unfried *et al.*, 2007 und 2008; Weissenberg *et al.*, 2010).

Der EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) ist eine ubiquitär vorkommende membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Kinasen aktivieren Proteine über eine reversible Bindung von Phosphatgruppen an Tyrosin, Serin oder Threonin von Zielproteinen. Ebenso können Phosphatasen die Phosphatgruppen abspalten und so die Zielproteine inaktivieren. Im menschlichen Körper wurden bisher 518 Kinasen und 147 Phosphatasen (Manning *et al.*, 2002; Moorhead *et al.* 2007) identifiziert, unter denen die Superfamilie der Protein-Tyrosin-

Kinasen (PTK) existiert, die sich wiederum in 58 membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und 32 zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen aufteilen (Robinson, *et al.*, 2000). Der EGFR besteht aus einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne am N-Terminus, einer kleinen hydrophoben Domäne, die als Membrananker dient, und einer intrazellulären Domäne mit der Kinasefunktion am C-Terminus. Insgesamt besteht der EGFR aus 1186 Aminosäuren und hat eine molare Masse von ungefähr 180 kDa. Der humane EGF-Rezeptor wird in 4 Isotypen aufgeteilt: EGFR (HER, ErbB1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Der bekannteste Ligand des EGFRs ist der Wachstumsfaktor EGF (*engl.* epidermal growth factor).

Im Jahr 1962 wurde von Stanley Cohen erstmals das Polypeptid EGF aus den Unterkieferdrüsen von Mäusen isoliert. Cohen stellte fest, dass EGF das Öffnen der Augen sowie die Bildung von Schneidezähnen von neugeborenen Mäusen beschleunigt und bekam für diese Entdeckung 1968 den Nobelpreis für Medizin. Der EGF gehört mit TGF- $\alpha$  (*engl.* transforming growth factor alpha), HB-EGF (Heparin-bindendes EGF), Amphiregulin, Epiregulin, Betacellulin sowie der Gruppe der Neureguline zu der Familie der EGF-artigen Liganden (Massague *et al.*, 1993). Diese Ligandenfamilie zeichnet sich durch eine konservierte Cystein-reiche Domäne aus, die in einer oder mehrerer Kopien wiederholt werden (Engel, 1989; Davis, 1990). Alle EGF-artigen Liganden werden zunächst als membranständige Pro-Proteine gebildet und bei Bedarf in die aktive Form überführt (Singh und Harris, 2005). Der humane EGF (hEGF) besteht aus 53 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von näherungsweise 6 kDa (Taylor, 1970). Er besitzt eine große Homologie zu Nagetierspezies (zum Beispiel 79% Identität beim Kaninchen (Bell, 1986)), sodass auch humanes EGF in der Lage ist, den EGFR von Ratten- oder Mauszellen zu aktivieren (Simpson, 1985).

#### 1.4.1 Aktivierung des EGFRs

Der EGFR spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von zellulären Prozessen und steht am Anfang von Signalkaskaden, die als Endpunkte Proliferation (Schmidt-Ullrich *et al.*, 1997), Zelldifferenzierung (Nicholson *et al.*, 2001), Inflammation (Lichtenberger *et al.*, 2013) und Apoptose (Reginato *et al.*, 2003) haben können. Die Bindung eines Ligandenmoleküls erfolgt gleichzeitig an zwei Rezeptormolekülen. Es folgt eine Dimerisierung der beiden Rezeptoren und somit kommt es zur Entstehung von entweder Homodimeren, wenn zwei Rezeptoren

desselben Isotypen an EGF binden, oder Heterodimeren, wenn zwei Rezeptoren von unterschiedlichen Isotypen ein Dimer bilden. An den C-terminalen Domänen wird durch diesen Vorgang die ATP-abhängige Tyrosinkinase aktiviert, und es kommt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors an spezifischen Phosphorylierungsstellen. Die Auswahl der Phosphorylierungsstellen hängt einerseits vom jeweiligen Ligandenmolekül und andererseits von den an der Dimerisierung beteiligten Isotypen ab. Der EGFR besitzt sieben Autophosphorylierungsstellen (Tyr974, Tyr992, Tyr1045, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148, Tyr1173) (Abe M., 2006; Mitsudomi und Yatabe, 2010) und vier Stellen, die nur von anderen Kinasen phosphoryliert werden können (Tyr820, Tyr845, Tyr891 und Tyr1101) (Biscardi *et al.*, 1999; Stover *et al.*, 1995). Tyr1173 ist als eine der wichtigsten Autophosphorylierungsstellen identifiziert worden, die bei Aktivierung an SHC- (*engl.* src-homology 2 domain containing) Proteine binden (Downward *et al.*, 1984). Durch PTPN6 (*engl.* protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6) kann dieser aktivierende Mechanismus negativ reguliert werden (Keilhack *et al.*, 1998). Im weiteren Verlauf der Signalkaskade interagieren intrazelluläre Signalproteine, wie PLC $\gamma$  (Phospholipase C-gamma) (Chattopadhyay *et al.*, 1999) oder GAP (Margolis *et al.*, 1990) oder Adaptorproteine, wie GRB1 und GRB2 (Giubellino *et al.*, 2011), mit dem Rezeptor. Der aktivierte Rezeptor-Protein Komplex wird nun über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert (Madhus und Stang, 2009) und aktiviert Signalkaskaden, wie den MAPK (*engl.* mitogen-activated protein kinase)-Signalweg oder den PI3K-Signalweg (She, 2005).

#### 1.4.2 Internalisierung und Deaktivierung des EGFRs

Der durch EGF aktivierte Rezeptor-Protein-Komplex rekrutiert das Strukturprotein Clathrin in die Membran. Clathrin bildet zusammen mit der Membran spezielle Vesikel, sog. ‚clathrin-coated pits‘, in die der Rezeptor aufgenommen wird (Vieira *et al.*, 1996). Diese schnüren sich nach der Anreicherung von Rezeptormolekülen an der Membran ab und transportieren den Rezeptor intrazellulär in einem gebildeten Membranvesikel (Sigismund *et al.*, 2008). Innerhalb weniger Minuten zerfällt die Clathrinhülle und der EGFR befindet sich in einem Vesikel, welches als frühes Endosom (*engl.* early endosome) bezeichnet wird. Über die Ubiquitin-Ligase cCbl kann der Rezeptor in diesem Zustand ubiquitiniert werden. Das hat zur Folge, dass der EGFR zu Lysosomen transportiert und dort abgebaut wird (Yarden, 2001). Die Entscheidung, ob der EGFR recycelt oder abgebaut wird, kann auch über die Bindung der

verschiedenen Liganden beeinflusst werden (Khan *et al.*, 2005). Im Falle des Abbaus des Rezeptors wird dieser nicht mit dem Protein cCbl (*engl.* casitas B-lineage lymphoma) bzw. vCbl, einer viralen Form von Cbl, für eine Ubiquitinierung markiert. Das hat zur Folge, dass der EGFR dephosphoryliert wird und das Endosom wieder mit der Zytoplasmamembran fusioniert. Die Rezeptormoleküle werden so recycelt und können erneut aktiviert werden (Gonzalez-Gaitan, 2008; Levkowitz *et al.*, 1998). Polo *et al.* (2014) konnte zeigen, dass im Fall des Liganden EGFs die anwesende Menge des EGFs den Abbau bzw. den Transport zur Membran beeinflusst. Bei niedrigen Konzentrationen von EGF wird der internalisierte EGFR recycelt und wieder zur Membran transportiert, während er bei höheren Dosen lysosomal degradiert wird (Sigismund *et al.*, 2013). Es wurden Hinweise gefunden, dass der EGFR nach der Internalisierung auch weiterhin als Signalplattform aktiv sein kann und über Signaltransduktion zum Beispiel Einfluss auf die Regulierung von Genen nimmt (Brand *et al.*, 2011). Laut einer Studie von Lenferink *et al.* aus dem Jahr 1998 wird ein Rezeptor-Homodimer recycelt, was zu einem konstanten EGFR-Level in der Membran führt. Ein Rezeptor-Heterodimer wird hingegen degradiert. Dies liegt an der geringeren Stabilität von den Rezeptor-Heterodimeren, sodass cCbl schnell von dem Rezeptor-Komplex dissoziiert (Yarden, 2001).

Neben der klassischen Aktivierung des EGFRs durch den Liganden EGF kann der Rezeptor auch über zellulären Stress, wie UV-Strahlung, Schwermetall-Ionen oder reaktive Sauerstoffspezies (z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aktiviert werden (Zwick *et al.*, 1999). Je nachdem, ob der EGFR über den Liganden EGF oder über zellulären Stress aktiviert wird, kommt es zu einem cSrc (*engl.* cellular sarcoma)-vermittelten Phosphorylierungssignal des Rezeptors und Veränderungen im Dimerisierungsverhalten (Filosto *et al.*, 2011). Nach Aktivierung durch oxidativen Stress ändert sich der Internalisierungsmechanismus zu Caveolin-1-/Lipid Raft-abhängiger Endozytose (Mineo *et al.*, 1999). Der Rezeptor wird dann in Caveolae internalisiert und diese H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Signaltransduktion durch lysosomalen Abbau des EGFRs gestoppt. Wenn Caveolin-1 hyperphosphoryliert wird, bleibt der Rezeptor aktiv und wird nicht degradiert (Kahn *et al.*, 2006).

### 1.4.3 EGFR-abhängige Signalwege über Erk 1/2 und Akt

Zu den am besten untersuchten Signalereignissen gehören die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk 1/2 (*engl.* extracellular-signal regulated kinase 1 and 2) über den Ras/Raf/MEK-Weg und die PI3K-vermittelte Phosphorylierung von Akt (Proteinkinase B).

**Aktivierung von Erk 1/2:** Nach Bindung des Liganden EGF an den EGF-Rezeptor autophosphoryliert sich dieser und die Adaptoren SHC und Grb2 (*engl.* growth factor receptor-bound protein 2) binden an die C-terminale Domäne des Rezeptors (Abb. 1.1). Grb2 bildet mit SOS (*engl.* son of sevenless) und Ras (*engl.* rat sarcoma) einen Proteinkomplex, der mit Ras als Adaptorprotein an die Serin/Threonin-Kinase Raf (*engl.* rat fibrosarcoma) bindet und diese dadurch aktiviert (Buday und Downward, 1993; Aronheim *et al.*, 1994; Schlessinger, 1993 und 1994). Raf ist die erste der drei in Reihe geschalteten MAPK (*engl.* Mitogen-activated protein kinase) des MAPK-Signalwegs (Kyriakis, 1999; Kumar *et al.*, 2003). Es existieren verschiedene Isotypen von Raf (C-Raf, A-Raf, B-Raf; Morrison und Cutler, 1997; Hagemann und Rapp, 1999), die alle nach Phosphorylierung die Kinasen Mek1/2 (*engl.* Mitogen-activated protein kinase kinase) aktivieren bzw. phosphorylieren. Der letzte Teil dieser Signalkaskade ist Erk 1/2 oder MAPK. Erk 1/2 kann nach seiner Aktivierung in den Nukleus internalisiert werden und dort durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. Untereinheiten von AP-1) die Genregulierung beeinflussen (Sánchez *et al.*, 1994).

**Aktivierung von Akt:** Eine alternative Signalkaskade zu dem MAPK-Signalweg, der durch den aktiven EGFR initialisiert werden kann, ist der PI3K/Akt Signalweg (Abb. 1.1). Der EGFR phosphoryliert dann nach seiner Aktivierung durch EGF PI3K (*engl.* phosphatidylinositol 3-kinase), die direkt - oder zunächst über IRS1 (*engl.* insulin receptor substrate 1) vermittelt - das membranständige Phospholipid PIP2 (*engl.* phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) durch Phosphorylierung zu PIP3 (*engl.* phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) umwandelt. Die Aktivierung von PIP3 rekrutiert das zentrale Schlüsselprotein Akt (Proteinkinase B) sowie PDK1 (*engl.* 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) zur Membran, sodass Akt durch PDK1 an Tyrosin 308 phosphoryliert wird. Über weitere Proteine kann mTOR (*engl.* mechanistic target of Rapamycin) aktiviert werden, welches in diesem Signalweg Transkriptionsfaktoren phosphoryliert (Manning und Cantley, 2007; Hemmings und Restuccia, 2012). Alternativ konnte auch gezeigt werden, dass Akt selber zum Nukleus transloziert und dort Transkriptionsfaktoren aktiviert (Andjelkovic *et al.*, 1997; Meier *et al.*, 1997; Neri *et al.*, 2002). In seiner zentralen Rolle hat Akt verschiedene Substrate mit verschiedenen zellulären Endpunkten, wie z.B. Proliferation oder Angiogenese (Marte und Downward, 1997; Unfried *et al.*, 2008).

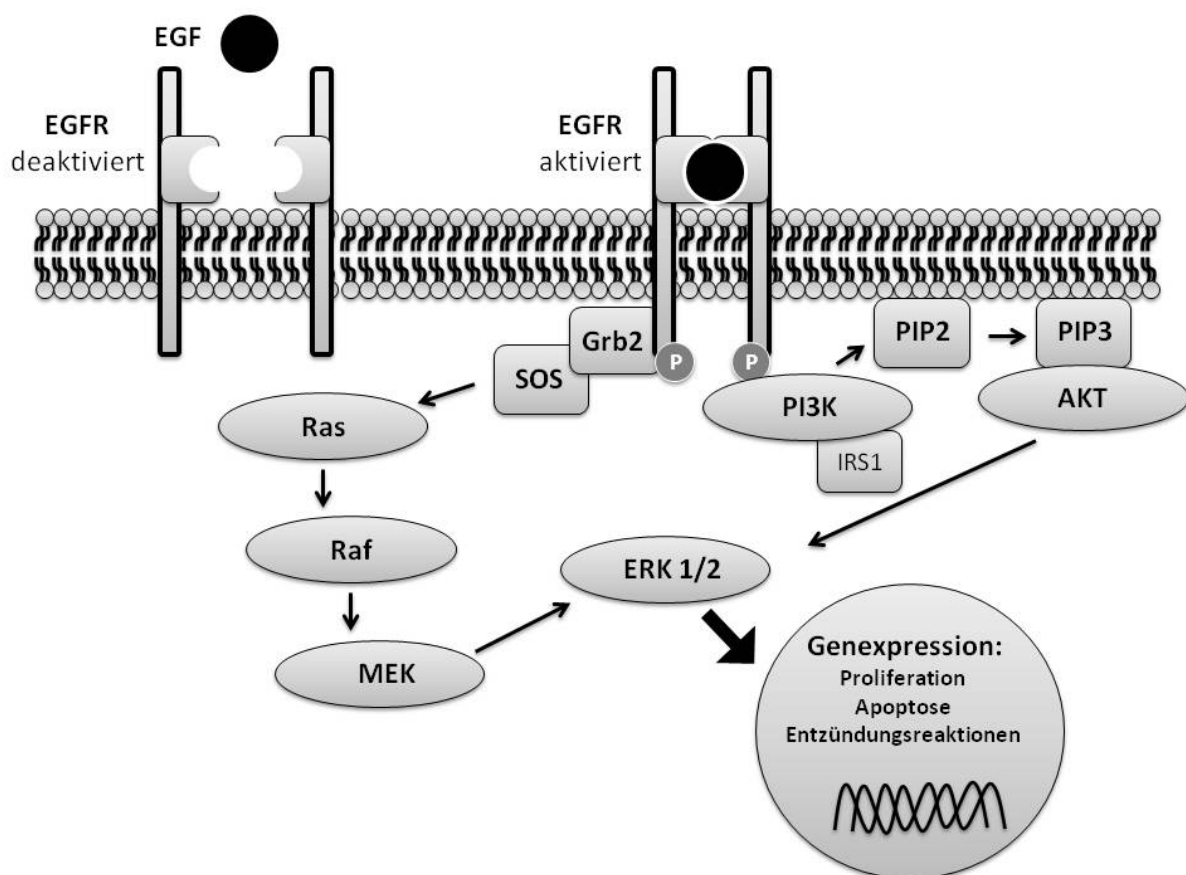


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht des MAPK und des PI3K/Akt Signalwegs.

Die beschriebenen EGFR-abhängigen Signalereignisse haben besondere Bedeutung für die Toxizität von hydrophoben Nanopartikeln. Für Kohlenstoffnanopartikel konnte gezeigt werden, dass diese Zellreaktion in Lungenepithelzellen zur Induktion der Zellproliferation führt (Sydlik et al 2006). Durch intrazellulären oxidativen Stress wird der EGFR Signalweg aktiviert und eine verstärkte Phosphorylierung der Kinasen Erk 1/2 und Akt beobachtet. Durch Studien mit Antioxidantien wurde gezeigt, dass diese Reaktion spezifisch durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst wird (Weissenberg *et al.*, 2010). Weitere Untersuchungen mit hydrophoben Nanopartikeln und größeren Kontrollpartikeln aus Manganoxiden, fumed Silika und Titandioxid, weisen darauf hin, dass diese Zellreaktionen nicht ausschließlich durch Kohlenstoffnanopartikel, sondern auch durch andere Materialien induziert werden können (Bieschke 2016). Vergleichsstudien, in denen Nanopartikel mit größeren (nicht-nano) Partikeln verglichen werden, weisen darauf hin, dass die Aktivierung des EGFR in Lungenepithelzellen ein toxikologisch relevanter Parameter für die Toxizität von hydrophoben Nanopartikeln ist.

## **1.5 Zielsetzung dieser Dissertation**

Kolloidale Nanomaterialien gewinnen für moderne technologische und medizinische Anwendungen aufgrund von geringen adversen Effekten immer mehr an Bedeutung und sind über nasschemische Synthesen leicht herzustellen. Zur toxikologischen Bewertung des Gefährdungspotentials von kolloidalen Nanopartikeln müssen die Mechanismen von Partikel-Zell-Interaktionen verstanden werden. Neben der Untersuchung der Zytotoxizität werden hier Reaktionen von Zellen, Geweben und Organen, die zur Entstehung und Ausprägung von Erkrankungen beitragen, untersucht.

Die Aktivierung des EGFRs stellt einen zentralen Mechanismus für die Regulation der epithelialen Gewebemöostase dar. Die Vorarbeiten mit verschiedenen hydrophoben Nanopartikeln unterstreichen die zentrale Bedeutung dieses Signalweges bei der Induktion von Proliferation, Apoptose und inflammatorischen Reaktionen durch diese Fremdstoffe. Die Bedeutung der EGFR-abhängigen Signaltransduktion bei der Interaktion von kolloidalen Nanopartikel mit epithelialen Zellen und ihr Zusammenhang mit einer möglichen Toxizität waren bislang unbekannt.

Die vorliegende Dissertation hatte deshalb das Ziel, die molekulare Wirkung von kolloidalen Silikananopartikeln (SiNP) auf EGFR-abhängige Signalereignisse im etablierten Versuchsmodell mit Rattenlungenepithelzellen zu untersuchen. Neben den Endpunkten Zytotoxizität, Proliferation und Apoptose sollte überprüft werden, ob die kolloidalen SiNP Einfluss auf die EGFR-abhängige Signaltransduktion mit den nachgeschalteten Kinasen Erk 1/2 und Akt nehmen und ob kausale Zusammenhänge zwischen dem Einfluss der Partikel auf die Signaltransduktion und den genannten Endpunkten bestehen. Die EGF-abhängige Translokation des EGFRs sowie eine Interaktion der Partikel mit molekularen Komponenten des Signalweges sollte u.a. mittels konfokaler Mikroskopie analysiert werden. Die Mechanismen der Partikelaufnahme sollte durch pharmakologische Inhibition von Clathrin- und Caveolin-abhängiger Endozytose (Chlorpromazin und Filipin) identifiziert werden. Die intrazelluläre Verteilung der Silikananopartikel sollte durch geeignete Fluoreszenzfärbungen von Vesikeln (EEA1, Rab7) aufgeklärt werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Nanopartikel

#### 2.1.1 Kolloidale Siliziumdioxidnanopartikel (SiNP)

Die in dieser Arbeit verwendeten kolloidalen Silikananopartikel wurden am INM - Leibniz-Institut für Neue Materialien gGmbH in Saarbrücken durch nasschemische Hydrolyse (bottom-up Synthese) von Tetraethylorthosilicat (TEOS) synthetisiert (Hartlen, 2008; Tavernaro *et al.*, 2017) und charakterisiert. Diese unmarkierten Partikelchargen werden im Folgenden ‚Me-Serie‘ genannt. Für die mikroskopischen Analysen wurden Partikel-Chargen mit dem fluoreszenten Farbstoff Atto647N-NHS hergestellt und im Folgenden als ‚Fd-Serie‘ bezeichnet. Die Partikelsynthese und ein Teil der Charakterisierung wurden durch die Kollegen der Arbeitsgruppe Nano-Zell-Interaktionen, die weitere Analytik, SiO<sub>2</sub>-Gehalt und Elektronenmikroskopie, durch die Kollegen der chemischen Analytik und physikalischen Analytik (INM) durchgeführt.

##### 2.1.1.1 Synthesen der Silikananopartikel

Im Folgenden werden die Syntheseschritte kurz aufgeführt.

##### **Me-Serie:**

**Si15:** Es wurden 91 mg L-Arginin in 69 ml Milli-Q-Wasser gelöst und mit 4,5 ml Cyclohexan überschichtet. Die Reaktionslösung wurde auf 45 °C (40 °C Innentemperatur) unter Rückfluss erhitzt. Beim Erreichen der Temperatur wurden 5,5 ml Tetraethylorthosilicat (TEOS) zu der Lösung gegeben. Dieser Ansatz wurde für 20 h bei 45 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Cyclohexan-Phase abgetrennt, die Partikelsuspension zur Aufreinigung gegen Milli-Q-Wasser dialysiert. Zuletzt wurde die Partikelsuspension durch einen 0,2 µm Zelluloseacetat (CA, polar) Spritzenvorsatzfilter steril gefiltert und bei 4 °C gelagert.

**Si25:** Die Synthese der Silikananopartikel mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 25 nm erfolgte analog der oben beschriebenen Methode. Im Unterschied zur Synthese von

Si15 Partikel wurde die Temperatur bei der Synthese verändert, sodass die Si25 Partikel bei 65 °C statt 45 °C stattgefunden hat.

**Si80:** Die Herstellung von Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 80 nm erfolgte in mehreren Wachstumsschritten ausgehend von den Si25 Partikeln. Für jeden Wachstumsschritt der Partikel wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt: 14 mg L-Arginin wurden in 36 ml Milli-Q-Wasser gelöst, mit 10 ml Silikapartikelsuspension (Si25 für Si45; Si45 für Si60; Si60 für Si80) versetzt, und mit 4,5 ml Cyclohexan überschichtet. Nachdem die Suspension auf 65 °C (Innentemperatur 60 °C) unter Rückfluss erhitzt wurde, wurden 3,52 ml TEOS zugegeben und bei einer Synthesedauer von 20 h erstellt.

Zur Aufreinigung wurden alle Partikelsuspensionen dialysiert, steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

#### **Fd-Serie:**

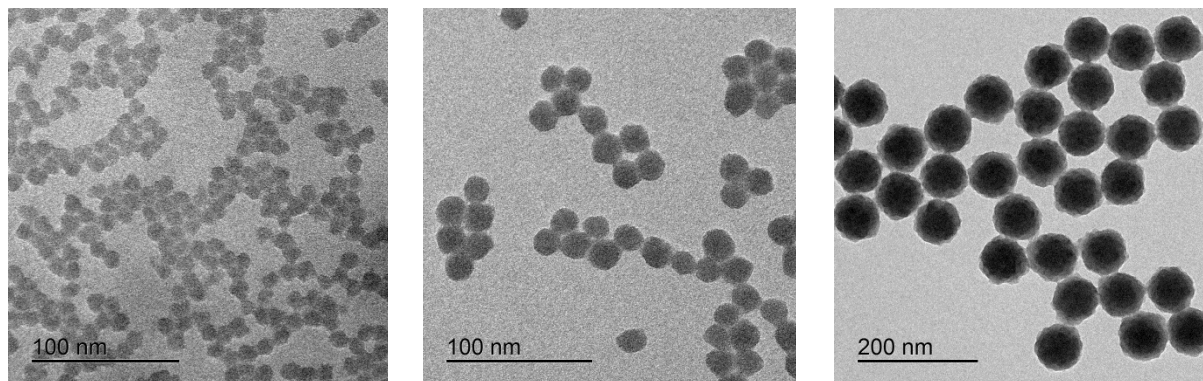
Die Synthese der fluoreszenzmarkierten Silikananopartikel unterscheidet sich von den unmarkierten Partikeln durch die Zugabe des Farbstoffs Atto647N-NHS-Ester, der zuvor mit Cysteinsäure und APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane) gekoppelt wurde. Der Farbstoff wird während der Synthese kovalent in die Partikelmatrix eingebunden. Eine halbe Stunde nach der Zugabe von TEOS wurden 100 µl des Farbstoffs Atto647N-NHS-Cys-APTES in die Synthese-Lösung gegeben. Alle anderen Mengen, Synthesebedingungen und Aufreinigungsschritte entsprachen denen der Me-Serie.

**Tabelle 2.1:** Übersicht der kolloidalen Silikananopartikel (nicht fluoreszente Me-Serie). Angegeben sind die jeweils kleinsten und größten Messwerte aller verwendeten Partikelchargen (Anhang Kapitel 6.1).

<b>Synthesename</b>	<b>Silika-Gehalt [g SiO<sub>2</sub>/Liter]</b>	<b>Partikel-Durchmesser (TEM) [nm]</b>	<b>ζ-Potential [mV]</b>
Me15	4,0 – 5,8	8 – 15	von -12 bis -29
Me25	3,4 – 6,6	21 – 25	von -24 bis -43
Me80	2,1 – 3,5	82 – 89	von -28 bis -39

**Tabelle 2.2:** Übersicht der kolloidalen Silikapartikel (fluoreszente Fd-Serie). Angegeben sind die jeweils kleinsten und größten Messwerte aller verwendeten Partikelchargen (Anhang Kapitel 6.1).

Synthesename	Silika-Gehalt [g SiO <sub>2</sub> /Liter]	Partikel- Durchmesser (TEM) [nm]	Extrapolierte spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	ζ- Potential [mV]
Me15	1,0 – 4,5	12 – 15	237 – 200	von -15 bis -19
Me25	5,1 – 8,0	25 – 27	124 – 113	von -21 bis -31
Me80	1,0 – 3,1	82 – 89	31 – 30	von -28 bis -39



**Abbildung 2.1: Repräsentative TEM-Aufnahmen der Silikananopartikel.** Die kolloidalen Dispersionen wurden für die Bildaufnahme über Nacht auf einem Kohlenstoffnetz eingetrocknet. **A:** Si15; **B:** Si25; **C:** Si80.

### 2.1.2 Fumed Silikapartikel (SiF)

Als Silikananopartikel, die in Wasser schwer dispergierbar sind, wurden flammenpyrolytisch hergestellte Silikapartikel des Herstellers Sigma-Aldrich (Silica, fumed; # S-5505; Lot# 101F-0016) erworben. Laut Napierska *et al.* (2010) handelt es sich bei den fumed Silika um hydrophobe Partikel. Unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen wurden die SiF Partikel frisch abgewogen, mit Reinstwasser versetzt [1 mg/ml] und in einem Ultraschallbad für eine Stunde bei 50 – 60 kHz/ 120 V dispergiert. Die RLE-Zellen wurden mit den Nanopartikeln einer Endkonzentration von 33 µg/ml belastet. (Zum Beispiel: Zugabe von 100 µl SiF-Dispersion in die 3 ml Medium einer 6-Well-Platte). Die Eigenschaften der fumed Silikapartikel sind in der Tabelle 2.3 zusammengefasst.

**Tabelle 2.3:** Eigenschaften der fumed Silikananopartikel.

Partikelname	spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	primärer Partikel-Durchmesser [nm]	ζ-Potential [mV]
SiF	200 ± 25	14	- 18 ± 0,5

### 2.1.3 Ultrafeine Kohlenstoffnanopartikel ‚Carbon Black‘ (CNP)

In dieser Arbeit wurden als Kontrollpartikel ultrafeine Carbon Black Partikel ‚Printex® 90‘ der Firma Evonic (Frankfurt/Main) mit bekannter Wirkung auf die EGFR-abhängige Signaltransduktion verwendet. Diese Kohlenstoffpartikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen abgewogen und in Milli-Q-Wasser in einem Ultraschallbad für eine Stunde bei 50 – 60 kHz/ 120 V dispergiert. Die RLE-Zellen wurden mit einer Konzentration von 33 µg/ml belastet, indem eine 1 mg/ml konzentrierte Stock-Lösung angesetzt wurde. Je nach Volumen der verwendeten Kulturplatte wurden unterschiedliche Mengen der CNP-Dispersion ins Medium gegeben. (Zum Beispiel: Zugabe von 100 µl CNP-Dispersion in die 3 ml Medium einer 6-Well-Platte). Die Eigenschaften der Kohlenstoffnanopartikel sind in der Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Eigenschaften der Kohlenstoffnanopartikel.

<b>Partikelname</b>	<b>spezifische Oberfläche [m<sup>2</sup>/g]</b>	<b>primärer Partikel- Durchmesser [nm]</b>	<b>ζ-Potential [mV]</b>
CNP	300 ± 25	14	- 26 ± 1

## 2.2 Zelllinie RLE-6TN

Bei den RLE-6TN (*engl.* rat lung epithelial-T-antigen negative) Zellen handelt es sich um eine SV-40-transfizierte, immortalisierte alveolare Typ II Lungenepithel-Zelllinie aus einer Ratte. Diese Zelllinie zeigt Eigenschaften von alveolären Typ II Zellen, wie Lipid-haltige Einschlusskörper (Lamellarkörperchen) und die Expression von Zytokeratin 8 und 19, jedoch lässt sich keine Aktivität der alkalischen Phosphatase nachweisen. Diese Zelllinie wurde aus einer 56 Tage alten männlichen Ratte des Stamms F344 durch Atemwegspfusion mit einer Pronaselösung isoliert (ATCC, Manassas, USA; Driscoll *et al.*, 1995).

## 2.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

### 2.3.1 Liste der verwendeten Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe	Integra, Zizers, CH
Abzug 2-454-GAND	Köttermann, Uetze
Autoklav Technoclav	Integra Biosciences, Fernwald
Autoklav X-75	Systec, Linden
Binokular Leitz	Leica Microsystems, Wetzlar
Cellomics ArrayScan HCS Reader	Thermo Scientific, , Waltham, USA
FACScalibur Flow Cytometer	BD Bioscience Immunocytometry System, San Jose, USA
Fluorchem Q	Alpha Innotec, Kasendorf
Fluoroskan Ascent	Labsystems Inc., Waltham, USA
Gelkammern Dual gel vertical unit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mini-Protean® Tetra System	Bio Rad, Hercules, USA
Heizblock Bioblock Scientific	Thermolyne Corp., Dubuque, USA
Horizontal-Wasserbadschüttler	Infors AG, Bottmingen, CH
Inkubator 08-56353	Binder GmbH, Tuttingen
Inkubator Galaxy 170 R	Eppendorf (New Brunswick), Hamburg
Inkubator HERAcell 240	Kendro, Hanau
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, CH
Mehrkanalpipette 50-200 µl	Socorex, Ecublens, CH
Mikroskop AE 2000	Motic, Wetzlar
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Wedel
Mikroskop BX 60 (Fluoreszenz)	Olympus, Hamburg
Mikroskop Quanta 400 FEG (Schottky-Emitter)	FEI, Hillsboro, USA.
Mikroskop Leitz	Laborlux K Leica Microsystems, Wetzlar
Minishaker MS1	IKA, Staufen
Multipette® Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Parallelsynthese-Apparatur	Radleys, Saffron Walden, UK
Photometer Multiskan Ascent 96	Labsystems Inc., Waltham, USA
Plattenlesegerät Infinite M200 pro	Tecan, Männedorf, CH
Pipetten Reserch Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Reinstwasseranlage Milli-Q Gen-Pure Pro UF	Thermo Scientific (TKA), Waltham, USA
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Kelheim
Schüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments, Kelheim
Spannungsgeber EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, USA
Spannungsgeber GPS 200/400	Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, USA
Spannungsgeber Power Pac HC 3000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Spectramax 190	Molecular devices, Sunnyvale, USA
Sterilbank	W.H. Mahl, Kaarst
Sterilbank 1675508-9	Clean Air Techniek bv, Weden, NL
Sterilbank Maxisafe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank Model 1,2	Thermo Scientific (Holten LaminAir), Waltham, USA
Sterilbank Model 1,5	Thermo Scientific (Holten LaminAir), Waltham, USA
Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) JEM-2100F	JEOL, Freising
Vortexer IKA MS 3 basic	Oehmen, Essen
Western Blot Transferkammer Criterion™-Blotter	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ultraschallbad, Branson 220	Branson, Danbury, USA
Waage PC 440, DeltaRange	Mettler-Toledo, Giessen
Waage Sartorius 1602 MP	Sartorius, Göttingen
Waage Iso 9001	Sartorius, Göttingen
Waage SI-234	Denver Instruments, Denver, USA
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Wasserbad 1004	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wasserbad AQUAline AL5	Lauda, Lauda-Königshofen
Wasserbad TW8	Julabo, Seelbach
Zellzähler Casy	OLS OMNI Life Science (Innovatis), Bremen
Zentrifuge Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta/RP	Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Sigma 3K30	B. Braun Biotech International, Melsungen
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge L8-M (Rotor 50,2 Ti)	Beckman, USA
Zetasizer Nano ZSP	Malvern Instruments, Malvern, UK
Zetatrac Analyser Model NPA 152	Microtrac, USA

### 2.3.2 Liste der Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
AcroCap™ Filter Unit	Pall, Ann Arbor, USA
Deckgläser Menzel-Gläser; Durchmesser 15 mm, rund, #1,5	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckgläser (22 x 22 cm)	Carl Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch Nadir, regulated cellulose membrane, MWCO: 10-20 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Falconröhrchen (15 mL; 50 ml)	BD Bioscience, Canaan, USA Greiner bio-one, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier (Whatman)	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Küvette FCC DTS 1070	Malvern Instruments, Malvern, UK
Macrosep Advanced 100kDa OMEGA	Pall Life Science, Dreieich
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Objektträger Menzel-Gläser geschnitten	Thermo Scientific, Waltham, USA
PAP-Pen (Fettstift)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran Hybond®-P	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Reaktionsgefäße für FACS-Analysen (5 ml)	BD Bioscience, Canaan, USA
Rotilabo ®-Spritzenfilter (0,2 µm; PES; #P821.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Rotilabo ®-Spritzenfilter (0,2 µm; PTFE; #P815.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Röntgenfilme SuperRX	Fuji, Düsseldorf
Steriler Spritzenfilter (0,2 µm; CA; #511-0061)	VWR International, Radnor, USA
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Geräte und Verbrauchsmaterialien werden an entsprechender Stelle im Methodenteil aufgeführt oder entsprechen dem üblichen Laborstandard.



### 2.3.3 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer	Lot-Nummer
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences	RPN2106	-
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim	A3678	-
Amphotericin B Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim BI Biological Industries, Israel	A2942 03-028-1	-
(3-Aminopropyl)-triethoxysilane (APTES)	ABCR, Karlsruhe	AB113628	10031149
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA; pH 7)	Applichem PanReac, Barcelona, Spain	A1391,0100	5x012140
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA; biotinfrei)	Carl Roth, Karlsruhe	01632	146241417
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe	T116.1	-
Calcium-Chlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Adrich, Steinheim	449709	-
Chlorpromazine hydrochlorid Solution (in MeOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C-904	FN01051501
ColorPlus Prestained Protein Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M.	P7712	
Cyclohexan	Carl Roth, Karlsruhe	7542.1	-
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)	Calbiochem, Schwalbach (Merck Millipore)	287810	-
(tri-sodium-)Citrat	Merck, Darmstadt	106448	-
DABCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan)	Carl Roth, Karlsruhe	0718.1	112183710
DAPI Mounting Medium	Life technologies, Grand Island, USA	P36935	-
Desoxycholsäure-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe	3484.1	-
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim Applichem, Darmstadt	472301 A3672,0050	- 3J003442
Di-natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe	T877.2	469111025
Dubelcco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim GIBCO Invitrogen, Grand Island, USA	D8537 14190-144	- -
rhEGF ( <i>E. coli</i> derived)	R&D Systems, Minneapolis, USA	236-EG	HLM4514081
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt	1000631000	-
Ethanol (p.a.)	Carl Roth, Karlsruhe	9065.1	-
Filipin III from <i>Streptomyces filipinensis</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim	F4767	010M4059
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim	F7524	060M3396
Fotochemikalien (GBX Entwickler und Fixierer)	Sigma-Aldrich, Steinheim	P7042	-

Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt	1039991000	-
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe	3783.1	272188441
Glycin	Fisher Scientific: Janssen Pharmaceutica, Geel, BL	BP381	-
Glycine	Carl Roth, Karlsruhe	T873.1	-
Hank's Buffered Saline Solution +Ca <sup>2+</sup> /+Mg <sup>2+</sup> (HBSS+/+)	Life technologies (Gibco), Grand Island, USA	H8264	098K2323
HMDS (1,1,1,3,3,3- Hexamethyldisilazan)	Carl Roth, Karlsruhe	3840.2	401177211
Immersionsöl (n= 1,516) Type F Immersion liquid (n <sub>e</sub> <sup>23</sup> = 1,518; v <sub>e</sub> = 46)	Merck, Darmstadt Leica, Wetzlar	104699 11513859	- -
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe	AE73.1	-
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe	6781.2	27898235
Kalium-dihydrogenphosphat	Fluka, Buchs, CH	60218	338595/1 196
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Steinheim	A5006	04111JJ
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim Life Technologies (Gibco), Grand Island, USA	G7513 25030-024	- 25030-123
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe	4227.3	-
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe	8388.1	-
Mowiol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe	07132	43899030
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Serva, Heidelberg	30175	-
Natriumchlorid (NaCl)	ABCR, Karlsruhe Merck, Darmstadt	AB118689 106404	1042723 -
Natrium- dihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe	T879.1	51683057
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe	0183.1	-
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt	109959	-
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim	P2256	-
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Steinheim	N4638	-
Nonidet P-40 (IGEPAL® Ca-630)	Sigma-Aldrich, Steinheim	I8896	-
Nutrient Mixture F-12 Ham (Kulturmedium)	Sigma-Aldrich, Steinheim Life Technologies (Gibco), Grand Island, USA	N4888 21765-029	- -
Paraformaldehyd 16% Solution	Electron Microscopy Science, Hatfield, USA	15710	150904
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Steinheim	P5726	-
Polyoxyethylensorbitan- Monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich, Steinheim	P9416	-
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim	P8340	-
Rotiphorese Gel 30 (0,8% BA, 30% AA; 31,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe	3029.1	-
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe	4621.1	-
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt	101510	-
Staurosporine from <i>Streptomyces</i> sp.	Sigma-Aldrich, Steinheim	S5921	-
Streptomycin/Penicillin (10 mg/mL; 10.000 units)	Sigma-Aldrich, Steinheim	P4333	095M4773V
Tetraethylorthosilicat	Sigma-Aldrich, Steinheim	8657 8	BCBJ1040V

(TEOS)			
N,N,N',N'- Tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe	2367.1	-
Trypanblau-Lösung (0,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim	T8154	-
Trypsin/EDTA Solution 10x	Sigma-Aldrich, Steinheim	59418C	-
Trypsin/EDTA Solution 1x (0,05/0,02%)	PAN Biotech, Aidenbach	P10-020500	-
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris)	Fluka, Buchs, CH	93352	316196/1 792
	Carl Roth, Karlsruhe	4855.1	-
Triton X 100	Carl Roth, Karlsruhe	3051.3	-
Wasserstoffperoxid-Lösung 30%	Merck, Darmstadt	107209	-
WST-1-Reagenz	Roche, Mannheim	5015944001	-
Ziegen-Normal-Serum	Abcam, Cambridge, UK	ab7481	-

## 2.3.4 Antikörper und Färbungen

### 2.3.4.1 Primär-Antikörper:

Antikörper	Hersteller	Bestell- nummer	Lot- Nummer	Reaktivität	Verdünnung
Akt Antibody	Cell Signaling Technologie, Cambridge, England	9272S	-	rabbit	1:1000 (WB)
EEA1, purified, Clone: 1G11	eBioscience Inc., San Diego, USA	14-9114-82	4271857	mouse	1:100 (IF)
EGF-Receptor Rabbit Ab	Cell Signaling Technologie, Cambridge, England	2332L	15	rabbit	1:50 (IF) 1:1000 (WB)
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	Cell Signaling Technologie, Cambridge, England	9102S	-	rabbit	1:2000 (WB)
phospho-Akt (Ser473) Antibody	Cell Signaling Technologie, Cambridge, England	9271S	-	rabbit	1:1000 (WB)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody	Cell Signaling Technologie, Cambridge, England	9101S	-	rabbit	1:2000 (WB)
p-EGF Receptor (Tyr1173) 53A5 Rabbit mAb	Cell Signaling Technologie, Cambridge, England	4407S	6	rabbit	1:100 (IF) 1:1000 (WB)
Rab7 (D95F2) XP(R) Rabbit mAb	Cell Signaling Technologie, Cambridge, England	9367	1	rabbit	1:100 (IF)

Für die Färbung von Western Blots (WB) wurden die Antikörper in 5% BSA/TBST (siehe 2.6.5) und für die Immunofluoreszenz Färbung (IF) in 1% BSA/DPBS verdünnt.

#### 2.3.4.2 Sekundär-Antikörper:

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Lot-Nummer	Reaktivität
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Life Technologies, Eugene, USA	A11029	1252783	mouse
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Life Technologies, Eugene, USA	A11008	1622775 1678787	rabbit
Anti-rabbit IgG (H&L) (goat) antibody Atto647N conjugated	Rockland Immunochemicals, Pennsylvania, USA	611-156-122	26577	rabbit
Goat-anti-rabbit Immunoglobulin G (IgG) HRP	Sigma-Aldrich, Steinheim	A0545	-	rabbit

#### 2.3.4.3 Weitere Färbungen

Farbstoff	Hersteller	Bestellnummer	Lot-Nummer	Reaktivität
WGA (Wheat germ agglutinine), AlexaFluor488 conjugated	Life Technologies (molecular probes), Eugene, USA	W11261	1755559	Interkalierung

#### 2.3.5 Verwendete Software

Software	Hersteller
Ascent Software	Thermo Scientific, Waltham, USA
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Cellomics Scan	Thermo Scientific, Waltham, USA
Cellomics View	Thermo Scientific, Waltham, USA
CellQuest 3.3	BD BioScience, Canaan, USA
FlowJo	FlowJo LLC, Ashland, USA
ImageJ/ Fiji (Fiji is just ImageJ)	Wayne Rasband

Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF)	Leica, Wetzlar
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Powerpoint 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SPSS statistics 20/23	IBM, Armonk, USA

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Charakterisierung der SINP

#### A) Hydrodynamischer Durchmesser und $\zeta$ -Potential der Partikel

Mit dem Zetasizer Nano ZSP (Malvern, UK) kann man zum einen den hydrodynamischen Durchmesser von Partikeln durch das Verfahren der dynamischen Lichtstreuung bestimmen und zum anderen ist das Gerät in der Lage, das  $\zeta$ -Potential von Partikeln zu messen. Bei dem  $\zeta$ -Potential handelt es sich um eine Größe, angegeben in mV, welche das elektrische Potential von Partikeln beschreibt. Bei elektrostatisch stabilisierten Partikeln beschreibt das  $\zeta$ -Potential das Abstoßungsverhalten und gibt einen Hinweis auf die Agglomerationseigenschaften der Partikel. Ein  $\zeta$ -Potential von 0 bedeutet, dass sich die Partikel nicht abstoßen und somit ein hohes Potential zur Agglomeration besteht, wenn die Partikel nicht sterisch stabilisiert sind.

Um die Größe und das  $\zeta$ -Potential von Partikeln zu bestimmen, wurde jeweils ein Milliliter der in Flüssigkeit dispergierten Partikel gemessen. Das Gerät besitzt zwei Messkanäle, die aus jeweils einem elektrisch-optischen Pol und einem gegenüberliegenden rein elektrischen Pol bestehen. In einer ersten Messung wurde dann der hydrodynamische Durchmesser durch das Rückstreuungsprinzip eines Doppler-verschobenen Laserlichts bestimmt, ohne dass ein elektrisches Feld angelegt wurde. Das  $\zeta$ -Potential wurde in einer zweiten Messung durch Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität der Partikel in einem elektrischen Feld gemessen. In dieser Studie wurden die verwendeten Silikananopartikel und Kohlenstoffnanopartikel in  $d_2H_2O$  unter Zugabe des Leitsalzes KCL [0,01 M] vermessen.

## **B) Primäre Partikelgrößen**

Die Primärgrößen aller Silikananopartikel wurden von dem Servicebereich ‚physikalische Analytik‘ mittels Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) vermessen. Dazu wurden die Partikel auf ein Kohlenstoffnetz getropft und über Nacht getrocknet. Die Morphologie wurde unter Verwendung eines JEM-2100F-Mikroskops (JEOL, Freising) bestimmt und der mittlere Partikeldurchmesser anhand der erstellten Bilder ausgewertet. Die Partikelgrößenverteilung wurde von einer Stichprobe aus 50 Nanopartikeln mit der Software ImageJ (Version 1.45, winPenPack Launcher) bestimmt.

### **2.4.2 Charakterisierung der SiNP in Anwesenheit von EGF**

Das  $\zeta$ -Potential und der hydrodynamische Durchmesser der Silikananopartikel wurden mit und ohne Zugabe von EGF [100 ng/ml] in wässriger Umgebung untersucht. Für die Messungen des  $\zeta$ -Potentials wurden von jedem der SiNP (Si15, Si25, Si80), neben den Stammlösungen, Verdünnungen mit Milli-Q-Wasser erstellt, sodass der SiO<sub>2</sub>-Gehalt der Partikelsuspensionen auf 0,066 mg/ml und 0,033 mg/ml eingestellt war. Es wurden für diese Messungen repräsentativ die Chargen Me15-K\_scw, Me25-L\_scw und Me80-L\_scw verwendet. Zunächst wurde das  $\zeta$ -Potential ohne EGF-Zugabe in den drei Verdünnungen gemessen.

Aufgrund der begrenzten Sensitivität der Messmethode und der Verfügbarkeit von EGF wurde das  $\zeta$ -Potential in Anwesenheit von EGF lediglich an einer EGF/Partikelmischung pro Partikelgröße bestimmt. Der gewählte SiO<sub>2</sub>-Gehalt betrug 0,066 mg/ml und ist doppelt so groß wie in den Zellversuchen. Das Verhältnis zwischen EGF und den Partikeln entspricht dem Verhältnis der anderen Experimente. Zu den Partikeln in der Verdünnung von 0,066 mg/ml wurde für 30 min EGF [200 ng/ml] zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Messung des  $\zeta$ -Potentials wurde zu allen Partikelsuspensionen ein Leitsalz (Kaliumchlorid [0,01 M]) zugegeben.

In einer zweiten Messreihe wurde der hydrodynamische Durchmesser der SiNP mittels dynamischer Lichtstreuung gemessen und über die Stokes-Einstein-Relation, genauer gesagt mithilfe der Kommulativmethode, ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte über zwei Varianten. Zum einen wurden die Daten der Stammlösungen ohne EGF-Zugabe über die

Volumenverteilung dargestellt. Bei dieser Variante wird angenommen, dass ausschließlich sphärische Partikel gemessen werden und Partikel bzw. Agglomerate mit einem größeren Volumen bzw. Durchmesser werden um den Faktor 1000 stärker berücksichtigt (Malvern, 2009). Zum anderen wurden die Daten, bei denen der hydrodynamische Durchmesser der Si80 Partikel [0,066 mg/ml] mit und ohne EGF gemessen wurde, durch die Intensitätsverteilung dargestellt. Dabei werden größere Partikel bzw. Agglomerate, wegen der größeren Streuung, um den Faktor 1.000.000 stärker berücksichtigt (Rayleigh-Streuung) (Berne und Pecora, 2000; Malvern, 2009). Die Si15 und Si25 Partikel haben zu geringe Durchmesser bzw. in der Verdünnung 0,066 mg/ml eine zu geringe Masse und wurden nicht gemessen. Außerdem ist die Volumenverteilung durch die Zugabe von EGF fehlerbehaftet und eignet sich nur bedingt für eine Darstellung der Ergebnisse.

In der Verdünnung 0,066 mg/ml wurden die Si80 Partikel mit EGF [200 ng/ml] für 30 min an Raumtemperatur für 30 min inkubiert und dann wurden alle oben beschriebenen Ansätze gemessen. Das Verhältnis zwischen SiNP und EGF entsprach bei der DLS-Messung den Konzentrationen, die auch in den anderen Versuchen verwendet wurden.

## 2.5 Zellkultur

Die RLE-Zellen wurden als Monolayer-Kultur in 175 cm<sup>2</sup> großen Plastik-Gewebekulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C gehalten [Luftfeuchtigkeit 95%, CO<sub>2</sub>-Gehalt 5%]. Alle 2-3 Tage wurde das alte Medium verworfen und durch neues Nährmedium ersetzt (Tabelle 2.3). Einmal pro Woche, wenn die Konfluenz der Zellen 70-80% erreicht hat, wurden die Zellen passagiert und 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in eine frische Kulturflasche ausgebracht. Für diesen Vorgang wurde das alte Medium verworfen und die Zellen mit etwa 37 °C warmen DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit ca. 6-8 ml warmen Trypsin/EDTA überschichtet und bis zur Ablösung im Brutschrank inkubiert. Bei der RLE-Zelllinie liegt die Inkubationszeit zwischen 5-10 Minuten, bis die Zellen nicht mehr adhären sind. Zur Unterstützung dieses Vorgangs wurde während dieser Zeit mit der flachen Hand dreimal von unten gegen die Kulturflaschen geklopft. Sobald sich der Zellrasen abgelöst hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von ca. 10 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension bei RT in einem 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß für 6 min zentrifugiert [100 x g] und erneut in 10 ml Medium aufgenommen. Ein Zehntel dieser Suspension wurde in einer neuen, 175 cm<sup>2</sup>

großen Kulturflasche mit 23 ml neuem Medium passagiert. Alternativ wurden die Zellen in T75 (75cm<sup>2</sup> Grundfläche) kultiviert. In diesem Fall wurden die Zellen zum Ablösen mit 3 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden sofort mit 9 ml Medium pipettiert und in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Bei 200 x g wurden die Zellen zentrifugiert und in 1 ml frischen Medium aufgenommen. Zur Erhaltung wurden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in einer neuen T75-Flasche mit 12 ml frischem Medium ausgesät.

**Tabelle 2.3:** Auflistung der verwendeten Medien zur Kultivierung der RLE-Zellen.

<b>RLE-6TN Nährmedium, Vollmedium</b>	Nutrient Mixture F-12 Ham 2 mM L-Glutamin 5% fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B
<b>RLE-6TN Nährmedium, Serum-reduziertes Medium</b>	Nutrient Mixture F-12 Ham 2 mM L-Glutamin 0,5% fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 2,5 µg/ml Amphotericin B

### 2.5.1 Exposition von RLE-Zellen gegenüber Nanopartikeln

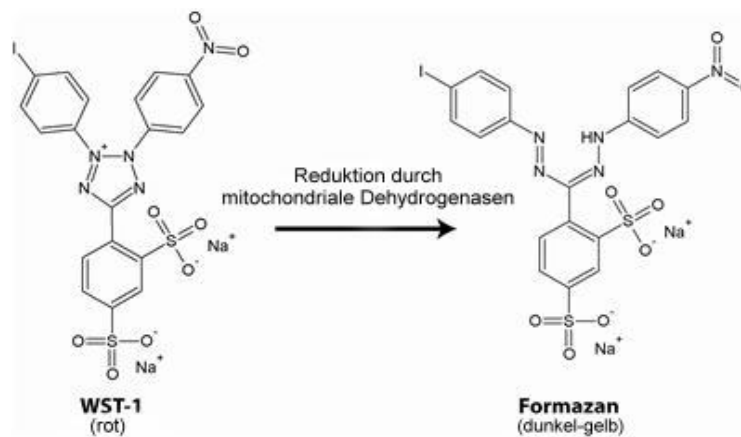
Für die Versuche wurden 2 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in einer Kulturplatte für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert (Konfluenz: 80-90%). Änderungen der Zellzahl wurden in den jeweiligen Versuchen angegeben. Dann wurde das alte Medium verworfen, mit warmem DPBS gewaschen, und die Zellen mit Serum-reduziertem Medium (0,5% FCS) für weitere 24 Stunden kultiviert (Tabelle 2.3). Dieser Vorgang hat zur Folge, dass die metabolische Aktivität der RLE-Zellen herabgesetzt wird und die Aktivierungslevels zellulärer Signalkaskaden minimiert werden. Die Zugabe der Partikel und der Kontrollsubstanzen erfolgte direkt in das Serum-reduzierte Medium bzw. bei den Proliferation-Assays in Vollmedium. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O verwendet, weil die Silikananopartikel in wässriger Lösung synthetisiert bzw. die Kohlenstoffpartikel und die fumed Silikapartikel dispergiert wurden. Alle anderen Substanzen, die in Experimenten zu den Zellen gegeben wurden, werden an entsprechender Stelle angeführt.



## 2.6 Zytotoxizitätsassays

### 2.6.1 Wst-1-Assay

Dieser Zytotoxizitätsassay ‚Cell Proliferation Reagent Wst-1‘ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) beruht auf dem Prinzip, dass ein rotes wasserlösliches Tetrazoliumsalz (Wst = *engl.* watersoluble tetrazoliumsalt) durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen mittels Reduktion zu einem gelben wasserlöslichen Formazansalz umgewandelt wird (Abb. 2.2). Diese Reduktion ist außerdem von der glykolytischen Produktion des NADPH in lebenden Zellen abhängig. Die Menge des gebildeten Formazansalzes korreliert direkt mit der metabolischen Aktivität von Zellen (Berridge *et al.*, 2005).



**Abbildung 2.2:** Reaktion vom WST-1-Reagenz zum Formazansalz (verändert von [www.gbiosciences.com](http://www.gbiosciences.com)).

Für diesen Versuch wurden die Zellen, wie unter Kapitel 2.6.1 beschrieben, kultiviert und für 24 Stunden mit den kolloidalen Silikapartikeln (Si15, Si25, Si80), den fumed Silikapartikeln (SiF), den Kohlenstoffpartikeln (CNP) [33 µg/ml für alle Nanopartikel; Stammlösung: 1 mg/ml] und der Kontrolle (H<sub>2</sub>O) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Natriumazid [1 M], welches eine schädigende Wirkung auf die Mitochondrien hat, verwendet. Nach der Belastungszeit wurde 10 µl/Well der wässrigen Wst-1-Lösung zugegeben und für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte die fluorimetrische Messung des gebildeten Formazansalzes bei der Filterkombination 440/600 nm (Absorption/Emission). Für jede Belastung wurden fünf Wells gemittelt, von denen das Mittel aus drei Wells als

Hintergrundabsorption abgezogen wurde. Zur Auswertung der ermittelten Daten wurde die Positivkontrolle ( $\text{NaN}_3$ ) gleich 0% Mitochondrien-Aktivität und die Negativkontrolle gleich 100% Aktivität gesetzt. Die Werte wurden in einem Balkendiagramm als prozentuale Viabilität dargestellt. Dieses Experiment wurde in einem zweiten Ansatz unter nicht Serum-reduziertem Medium wiederholt. Dafür wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  in Vollmedium (5% FCS) für 24 Stunden kultiviert und dann für weitere 24 h mit Nanopartikeln belastet. Desweiteren wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

### 2.6.2 Neutralrot-Assay

In dem Neutralrot-Assay wird die Integrität der Lysosomen durch eine Farbreaktion überprüft. Der Farbstoff Neutralrot (Abb. 2.3) diffundiert durch die Zellmembran, jedoch nur in intakten Lysosomen ist er nach einem Waschschrift auch noch vorhanden. Der Grund dafür ist der saure pH-Wert in den Lysosomen (ca. 5,5), der den kationischen Farbstoff Neutralrot protoniert und somit für die Membran unpassierbar macht. Aus Zellen, deren Lysosomen keine intakte Membran mehr haben, wird der Farbstoff Neutralrot ausgewaschen, sodass die Menge an Farbstoff direkt mit der Funktionalität und Viabilität von Lysosomen korreliert werden kann.

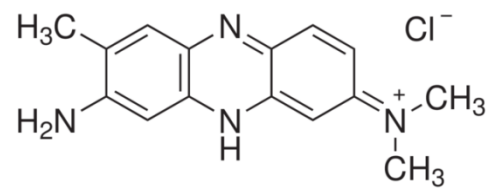


Abbildung 2.3: Neutralrot (Sigma-Aldrich).

Für die Durchführung des Assays wurden RLE-Zellen, wie unter Kapitel 2.6.1 beschrieben, in einer 96-Well Mikrotiterplatte kultiviert (fünffach Bestimmung pro Partikel). Die Zellen wurden dann für 15 Minuten, 4, 8 und 24 Stunden mit den kolloidalen Silikapartikeln (Si15, Si25, Si80), dem fumed Silikapartikel (SiF), dem Kohlenstoffpartikel (CNP) [33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für alle Nanopartikel; Stammlösung: 1  $\text{mg}/\text{ml}$ ] und der Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ) belastet und anschließend zweimal mit DPBS gewaschen. Im Anschluss wurde pro Well 200  $\mu\text{l}$  der Neutralrot-Inkubationslösung zugegeben und die Platte für 60-90 Minuten im Brutschrank bei 37  $^\circ\text{C}$  inkubiert (Tab. 2.4). Sobald eine deutliche Rotfärbung der Zellen eintrat, wurde die Inkubationslösung verworfen und 100  $\mu\text{l}/\text{Well}$  von der Fixierlösung hinzu pipettiert, welche sofort wieder verworfen wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit DPBS wurde 100  $\mu\text{l}$  der Extraktionslösung dazu gegeben und die Zellen für 15 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur lysiert. Die Messung des freigesetzten Farbstoffs erfolgte an einem ELISA Reader mit der Filterkombination 540/550 nm.

**Tabelle 2.4:** Verwendete Lösungen des Neutralrot-Assays.

<b>Neutralrot-Inkubationslösung</b>	5 mg Neutralrotpulver auf 100 ml Serum-reduziertes FCS-Medium
<b>Fixierlösung</b>	1% Formaldehyd und 1% CaCl <sub>2</sub> in dH <sub>2</sub> O
<b>Extraktionslösung</b>	50% Ethanol und 1% Essigsure in dH <sub>2</sub> O

## 2.7 Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies

### 2.7.1 Zellfreier DCF-Assay

Dieser Assay detektiert eine Partikel-abhängige Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies im zellfreien Medium. Wie beim DCF-Assay mit Zellen wurde die Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein als Diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) verwendet. Um das H<sub>2</sub>DCF von dem Diacetat zu spalten und die Sonde aktiv zu machen, wurde ein Aliquot eines 100 mM Stocks (in DMSO gelöst) mit einem Aliquot 1 M NaOH im Verhältnis 1:1 gemischt. Die hydrolytische Reaktion der Acetat-Abspaltung erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Diese Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 0,1% DMSO in Serum-reduziertem Medium gestoppt und die Konzentration des H<sub>2</sub>DCF auf 20 µM eingestellt.

In einer 96-Well-Platte (0,32 cm<sup>2</sup>/Well) wurden zunächst 10 µl der Partikelsuspensionen [Stammlösung: 1 mg/ml] in einer fünffachen Bestimmung vorgelegt und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [1 µM] zugefügt. Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produziert als stabiles Oxidationsmittel reduzierende Bedingungen und leitet Fenton-(bzw. Haber-Weiss-) ähnliche Reaktion ein, die in einer Kettenreaktion intrinsisch weitere ROS produzieren können (Borm *et al.*, 2007). Anschließend wurde in jedes Well 100 µl der H<sub>2</sub>DCF/Medium-Lösung zugegeben und umgehend die fluorimetrische ROS-Entstehung an einem Fluorometer (Fluoroscanner Ascent, Labsystems) durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 37 °C alle zwei Minuten mit der Filterkombination 485/538 nm (Absorption/Emission) über einen Zeitraum von einer halben Stunde. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert mit der relativen ROS-Entstehung und diente zu deren Bestimmung.

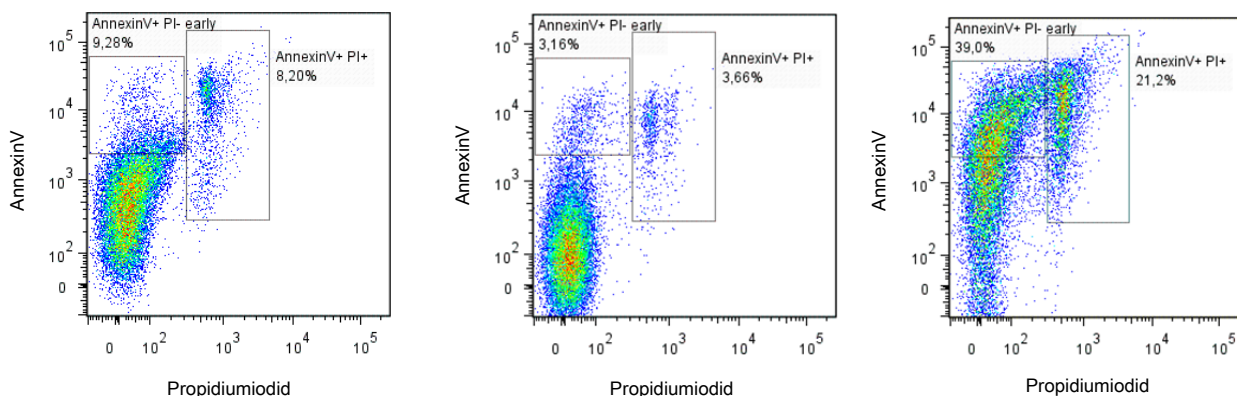
## 2.7.2 Zellbasierter DCF-Assay

Anhand des DCF-Assays (abgewandelt nach Bass *et al.*, 1983) lassen sich in den Zellen entstandene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) fluorimetrisch detektieren. Für die Durchführung wurden die RLE-Zellen in 6-Well Platten kultiviert, mit Serum-reduziertem Medium inkubiert und mit den kolloidalen Silikapartikeln (Si15, Si25, Si80), den fumed Silikapartikeln (SiF), den Kohlenstoffpartikeln (CNP) [33 µg/ml für alle Nanopartikel; Stammlösung: 1 mg/ml] und der Kontrolle (H<sub>2</sub>O) belastet. Nach einem Waschschrift mit 2 ml/Well HBSS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>), wurden die Zellen mit der Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H<sub>2</sub>DCF; 20 µM, 0,1% DMSO Lösung in 1 ml warmen HBSS (+/+)) überschichtet und dann für 20 min im Brutschrank inkubiert. Das H<sub>2</sub>DCF wird dabei als Diacetat eingesetzt (H<sub>2</sub>DCF-DA), das die Zellmembran passieren kann. Im Innern der Zelle wird das H<sub>2</sub>DCF-DA von Esterasen gespalten und liegt nun in der reduzierten Form vor. In Anwesenheit von ROS wird das nicht-fluoreszierende H<sub>2</sub>DCF in den fluoreszierenden Farbstoff DCF umgewandelt, der mit der Menge an ROS in den Zellen korreliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit HBSS gewaschen und bis zur Ablösung mit Trypsin inkubiert (3-5 min). Die Zellen wurden dann mit 1 ml/Well HBSS (+/+) in FACS-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (2 min, 1000 x g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 µl resuspendiert. Bis zur Messung an einem FACS (*engl.* Fluorescence activated cell sorter) wurden die Proben im Dunkeln gehalten. Am FACS wurde dann die Größe (FSC = Forward Scatter), die Granularität (SSC = Sideward Scatter) und die Fluoreszenzintensität (FL-1, DCF) von 10.000 Ereignissen gemessen und mit der Instrumenten-Software BD Cell Quest 3.3 die mittlere Fluoreszenzintensität ausgewertet.

## 2.8 Apoptose/Nekrose Assay

Um Apoptose oder Nekrose von Zellen zu bestimmen, wurde nach einer Schädigung mit Nanopartikeln eine AnnexinV- und Propidiumiodid (PI)-Färbung an lebenden Zellen durchgeführt und an einem FACS analysiert. Dazu wurden in einer 6-Well-Platte 3 x 10<sup>4</sup> RLE-Zellen pro cm<sup>2</sup> ausplattiert und mit Vollmedium kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den kolloidalen Silikapartikeln (Si15, Si25, Si80), dem fumed Silikapartikel (SiF), dem Kohlenstoffpartikel (CNP) [33 µg/ml für alle Nanopartikel; Stammlösung: 1 mg/ml], der Kontrolle (H<sub>2</sub>O) und Staurosporin [0,3 µM] als Positivkontrolle belastet. Die Zugabe von

EGF beim zweiten Ansatz dieses Versuches erfolgte nach den Partikeln mit einer Konzentration von 100 ng/ml. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst. Diese Reaktion wurde mit 600 µl Serum-haltigem FCS Medium (5%) gestoppt und die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann bei 4 °C und 200 x g für 6 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl AnnexinV-Binding Buffer (AVBB) resuspendiert. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben, indem die Zellen im Dunkeln mit 50 µl AVBB, mit 2,5 µl AnnexinV FITC und 2,5 µl PI vorinkubiert wurden und dann für 45 min in FACS-Röhrchen gegeben wurden. Nach der Inkubationszeit wurde 200 µl AVBB pro FACS-Röhrchen zugegeben und an dem Durchflusszytometer gemessen. Die Größe (FSC = Forward Scatter), die Granularität (SSC = Sideward Scatter) und die Fluoreszenzintensität (FL-1: Em519; FL-2: Em617) von 10.000 Ereignissen wurde gemessen und mit der Instrumenten-Software BD Cell Quest 3.3 die mittlere Fluoreszenzintensität und die Verteilung ausgewertet. AnnexinV bindet an das Phospholipid Phosphatidylserin, das apoptotische Zellen auf ihrer Membran präsentieren, während PI nur von Zellen mit geschädigter Membran (nekrotische Zellen) aufgenommen wird. Spät-apoptotische Zellen sind sowohl AnnexinV als auch PI positiv gefärbt. Bei der Auswertung dieses Versuches konnten so AnnexinV-positive Zellen (Apoptose) von AnnexinV- und PI-positiven Zellen (Nekrose) unterschieden werden, während nicht nekrotische bzw. apoptotische Zellen ungefärbt bleiben. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und die AnnexinV- bzw. PI-positiven Zellen identifiziert. Dazu wurden Bereiche definiert, in denen die Fluoreszenzintensitäten ihre Maxima haben (Abb. 2.4) und die Ereignisse prozentual zur Gesamtzellzahl bestimmt. Die so erhaltenen Werte wurden addiert und in einem Balkendiagramm dargestellt. Von diesem Experiment wurden unabhängige Triplikate erstellt.



**Abbildung 2.4:** Repräsentative Auswertung der im Apoptose/Nekrose Assay bestimmten Fluoreszenzintensitäten. Links: H<sub>2</sub>O-Kontrolle; Mitte: EGF-Kontrolle; Rechts: Staurosporin-Kontrolle.

## 2.9 Proteinbiochemische Methoden

Zur Untersuchung der Proteinexpression in RLE-Zellen wurden folgende Schritte durchgeführt:

### 2.9.1 Zellyse und Proteinextraktion

Die in 6-Well Platten kultivierten und belasteten Zellen wurden zweimal mit 4 °C kaltem DPBS gewaschen und mit RIPA (*engl.* radioimmuno precipitation assay)-Puffer (100-120 µl pro Well) überschichtet (Tab.2.5). Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde bei 4 °C wurden die Zellen durch Klopfen und/oder Abschaben lysiert und in Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) überführt. Anschließend wurden die Zellysate bei 4 °C für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Von den Proben wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, und anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Auswertung bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.5:** Zusammensetzung des RIPA-Puffers.

<b>RIPA-Puffer:</b>
25 mM Tris/HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
0,1 mM EDTA, pH 8,0
1% Nonidet P-40 (Igepal CA-630)
1% Desoxycholsäure-Natriumsalz
0,1% SDS
0,025% NaN <sub>3</sub>
1% Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, kurz bevor zugesetzt
1% Protease Inhibitor Cocktail, kurz bevor zugesetzt

### 2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) mithilfe des DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden 5  $\mu$ l der Proben sowie 5  $\mu$ l eines BSA-Proteinstandards jeweils in Doppelbestimmung pipettiert. Die im Kit enthaltenen Lösungen A (eine basische Kupfer-Tartart-Lösung) und S (keine Angabe des Herstellers; muss bei Anwesenheit von Detergenzien beigefügt werden) wurden im Verhältnis 20  $\mu$ l Substanz S pro 1 ml Substanz A gemischt und 25  $\mu$ l dieser Mischung den Proteinextrakten zugeführt. Unmittelbar im Anschluss wurde pro Well 200  $\mu$ l der Substanz B, verdünntes Folin-Reagenz (Folin-Ciocalteus' Phenol-Reagenz) zugefügt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT in Dunkelheit wurde die Absorption bei der Wellenlänge 630 nm gemessen. Die Konzentrationen der Proteinextrakte wurden mit der Gradengleichung des BSA-Standards errechnet.

### 2.9.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinextrakte wurden nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970) in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Für diese Methode wurde ein zwei-schichtiges Gel, bestehend aus Sammelgel und Trenngel (Tab. 4), hergestellt. Zwischen zwei aufgestellten Glasplatten der Gelelektrophorese-Apparatur wurde erst ein 1 mm dickes, 2/3 füllendes 10%-iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol zur Begradigung der Oberfläche überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol entfernt, ein 3%-iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen und vor der Polymerisation mit einem Kamm für die Probenaschen versehen. Die Gele wurden, wie in der Tabelle 4 angegeben, angesetzt. Als Auslöser der Polymerisation wurde kurz zuvor 20  $\mu$ l TEMED beigemischt. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde es in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und mit Laufpuffer beschichtet (Herstellung siehe Tab. 2.6). Anhand der Proteinbestimmung wurden die Proteinproben mit 2 x Elektrophorese-Probenpuffer auf eine Konzentration von 6  $\mu$ g Protein/20  $\mu$ l Puffer eingestellt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Gelkammern wurden mit den Proben gefüllt und die Elektrophorese zunächst bei einer konstanten Spannung von 50-75 V für 30 min gestartet. Nach Einlaufen der Lauffront in das Trenngel wurden die Proteine bei 100-120 V für eine Stunde aufgetrennt. Als

Protein-Größenstandard wurde die Proteinleiter ‚ColorPlus Prestained Protein Ladder‘ der Firma NEB (Frankfurt) verwendet.

**Tabelle 2.6:** Zusammensetzungen der für die Gel-Elektrophorese verwendeten Gele und Puffer.

<b>Trenngel</b>	10% Rotiphorese Gel 30 375 mM TrisHCl, pH 8,8 0,1% SDS 0,05% APS 20µl TEMED
<b>Sammelgel</b>	3% Rotiphorese Gel 30 60 mM TrisHCl, pH 6,8 0,1% SDS 0,05% APS 20µl TEMED
<b>Laufpuffer</b>	50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1% SDS
<b>Elektrophorese-Probenpuffer</b>	120 mM Tris/HCl, pH 6,8 2% SDS 20% Saccharose 1% β-Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau

#### 2.9.4 Western Blot Transfer

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine (PVDF-)Membran übertragen. Diese wurden in eine Transferkammer zwischen zwei in Transferpuffer (Tab. 2.7) getränkten Plastikschwämmen und zwei Whatman-Filterpapieren, die ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden, gelegt. Zwischen die Filterpapiere wurden das Gel und die PVDF-Membran gelegt und die fest verschlossene Transferkammer in den, mit Transferpuffer befüllten, Tank eingespannt, sodass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode



ausgerichtet wurde. Die Proteine wurden unter Kühlung für 1,5 Stunden bei 50 V auf die Membran transferiert.

**Tabelle 2.7:** Zusammensetzung des Transferpuffers.

<b>Transferpuffer (pH 8,3)</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 10% Methanol
--------------------------------	---

### 2.9.5 Immunologische Proteinnachweise durch Chemilumineszenz

Zunächst wurde die Membran für ungefähr 1,5 Stunden mit einer BSA-Blockierlösung auf einem Schüttler bei RT inkubiert, um unerwünschte Bindestellen der Membran auszuschalten. Über Nacht wurde dann die Membran mit dem Primär-Antikörper bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Sekundär-Antikörpers unter Schütteln für 2 Stunden bei RT. Zwischen den Inkubationsschritten sowie am Ende wurde die Membran jeweils 4 x für 5 min mit TBST bei RT auf dem Schüttler gewaschen (Tab. 2.8). Die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Chemilumineszenz wurde mit dem ECL Plus TM Western Blotting Detection System (GE Healthcare, UK) durchgeführt, indem die Membran für 5 min mit 1 ml von dem Nachweis-Reagenz (20 µl Substanz B auf 2 ml Substanz A) bei RT inkubiert und danach das Signal mittels Autoradiographie auf einen Röntgenfilm übertragen wurde.

**Tabelle 2.8:** Zusammensetzungen der Wasch- und Blockierungslösung.

<b>TBST-Waschlösung (Tris-gepufferte Saline)</b>	20 mM TrisHCl, pH 7,6 137 mM NaCl 0,1% Tween 20
<b>Blockierungslösung</b>	5% BSA in TBST

## 2.9.6 Belastungs-Szenarien für Proteinnachweise (EGFR, Erk, Akt)

Die Detektion des EGFRs mittels Western Blot fand unter Serum-reduzierten Bedingungen statt, indem die kolloidalen Silikananopartikel (Si15, Si25, Si80), fumed Silikapartikel (SiF) und Kohlenstoffpartikel (CNP) [33 µg/ml] für 5 min in das Medium gegeben wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und mit der Proteinextraktion begonnen.

Die Aktivierungslevels der Proteinkinasen Erk 1/2 und Akt wurden zum einen mittels Western Blot und zum anderen durch Immunofluoreszenzfärbung und anschließender Detektion am Cellomics ArrayScan™ (siehe Kapitel 2.10) bestimmt. Für die Versuche mit Western Blots (Kapitel 3.5.1) wurden RLE-Zellen für 30 min mit Nanopartikeln belastet, gewaschen und für weitere 5 min mit Serum-reduziertem bzw. EGF-haltigem Medium inkubiert.

Die Signale der phosphorylierten Proteine wurden mit Signalen der Gesamtmenge an Protein (totalEGFR, totalErk, totalAkt) als Ladekontrolle verrechnet.

## 2.10 Quantitative Analyse von Erk 1/2 und Akt (Cellomics ArrayScan™)

Für diesen Versuch wurden RLE-Zellen in einer 96-Well Platte kultiviert (Kapitel 2.6.1). Die Zugabe von kolloidalen Nanopartikeln Si15, Si25 und Si80 [33 µg/ml] erfolgte für 30 min bei 37 °C im Inkubator. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Belastungsmedium abgesogen und durch frisches Serum-reduziertes Medium für 5 min bzw. 3,5 h ersetzt. In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Serum-reduzierte Medium zusätzlich mit EGF [100 ng/ml] für 5 min bzw. 3,5 h ersetzt. Danach wurden die Zellen der verschiedenen Ansätze mit warmem DPBS gewaschen und für 20 min mit Paraformaldehyd (4% in DPBS) fixiert. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie mit 0,2% TritonX-100 in (DPBS; 100 µl/Well) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3% BSA + 5% ZNS + 0,3% TritonX-100 (in DPBS; 100 µl/Well) für 20 min blockiert. Die Inkubation mit phospho-spezifischen Primär-Antikörpern (Verdünnung 1:50) für Erk 1/2 und Akt erfolgte in 1% BSA/ZNS (Ziegen-Normal-Serum) (in DPBS; 25 µl/Well) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Antikörperlösungen entfernt und die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Die Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:800 in DPBS; 25 µl/Well) bzw. DAPI (Verdünnung 1:1000), zum Färben des Zellkerns, wurden für 2 h bei 37 °C zugegeben.

Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und bis zur Messung in 100  $\mu$ l DPBS gelagert. Eine quantitative Auswertung sowie die mikroskopische Analyse der aktivierten Proteine erfolgte mittels des ArrayScan™ High-Content Systems (ThermoFisher Scientific).

## 2.11 Proliferationsassay mit Trypanblau

Um die Proliferationsrate von Zellen zu bestimmen, wurde eine definierte Zellzahl von  $1,8 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 6-Well Platten (ca. 68.000 Zellen/Well) für 24 h kultiviert. Danach erfolgte die Belastung für 24 und 48 Stunden mit den kolloidalen Silikapartikeln (Si15, Si25, Si80), den fumed Silikapartikeln (SiF), den Kohlenstoffpartikeln (CNP) [33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für alle Nanopartikel; Stammlösung: 1  $\text{mg}/\text{ml}$ ] und der Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ). In einem weiteren Versuchsansatz wurde zu den Zellen zusätzlich zu den Silikananopartikeln der Wachstumsfaktor EGF [100  $\text{ng}/\text{ml}$ ] für die gesamte Belastungszeit zugegeben. Im Anschluss an die Belastungszeit wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit 100  $\mu$ l Trypanblau-Lösung (0,4%, Sigma Aldrich) für 3 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach Ablauf der Zeit wurden ein Aliquot von 10  $\mu$ l in einer Neubauer-Zählkammer und die ungefärbten (lebenden) sowie die gefärbten (toten) Zellen gezählt. Es wurden unabhängige Triplikate dieses Versuches durchgeführt.

## 2.12 Translokation des EGFRs

Sterile Deckgläser wurden mit Serum-haltigem Medium (5%) in 6-Well Platten beschichtet. Darauf wurden  $2 \times 10^4$  RLE-Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausplattiert, nach 18 h mit DPBS gewaschen und für 24 h mit Serum-reduziertem Medium (0,5%) inkubiert. Die Zellen wurden dann für 5 min unter folgenden Bedingungen belastet: a) Silikananopartikel, b) EGF, c) erst SiNP und unmittelbar danach EGF, d) erst EGF und unmittelbar danach SiNP. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit warmem DPBS gewaschen und bei Raumtemperatur mit Methanol-freiem Formaldehyd (4% in DBPS) für 20 min fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 min bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und 3 x mit DBPS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 5% Ziegen Serum + 0,3% Triton X-100 (in DPBS) für 20 min blockiert. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde mit einem Fettstift ein Quadrat auf einen

Objektträger gezeichnet und 65 µl EGFR-Antikörperlösung (1:50 in 1% BSA (in DPBS)) in die Mitte des Quadrats gegeben. Die Deckgläser mit den Zellen wurden dann mit der Zellseite auf das Quadrat gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser zurück in die 6-Well Platte gelegt und 3 x mit DPBS für 5 min gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper AlexaFluor594 (1:800 in DPBS; 800µl/Well) erfolgte abgedunkelt in den Wells für 1 h bei 37 °C. Die Deckgläser wurden 3 x mit DPBS für 15 min vor Licht geschützt gewaschen und mit 30 µl DAPI-haltigem Mounting Medium auf Objektträgern eingebettet. Bis zur Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

## 2.13 Konfokales Laser-Raster-Mikroskop ‚Leica TCS SP5‘

### 2.13.1 Funktionsprinzip

Um ein Präparat mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, werden Proteine oder Zellstrukturen zum Beispiel durch Fluorophor-gekoppelte Antikörper angefärbt. Die Fluoreszenzmarkierung dient der Kontrastverstärkung, sodass Strukturen, die mit einem Lichtmikroskop nicht erkennbar sind, betrachtet werden können. Ein Fluorophor kann durch Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge von seinem Grundzustand in einen Singulettzustand mit höherem Energielevel angeregt werden (Abb. 2.5). Ein Teil dieser absorbierten Energie geht durch Vibrationen des Moleküls verloren (strahlungslose Relaxation). Beim Übergang des angeregten Fluorophors zurück in seinen Grundzustand wird Licht emittiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz. Das emittierte Licht besteht, aufgrund des Energieverlustes, aus Licht mit einem geringeren Energielevel bzw. einer größeren Wellenlänge. Durch die Möglichkeit, mehrere Zellstrukturen (bzw. Nanopartikel) spezifisch zu detektieren, ist die Fluoreszenzmikroskopie eine gute Methode, um Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen zu untersuchen.

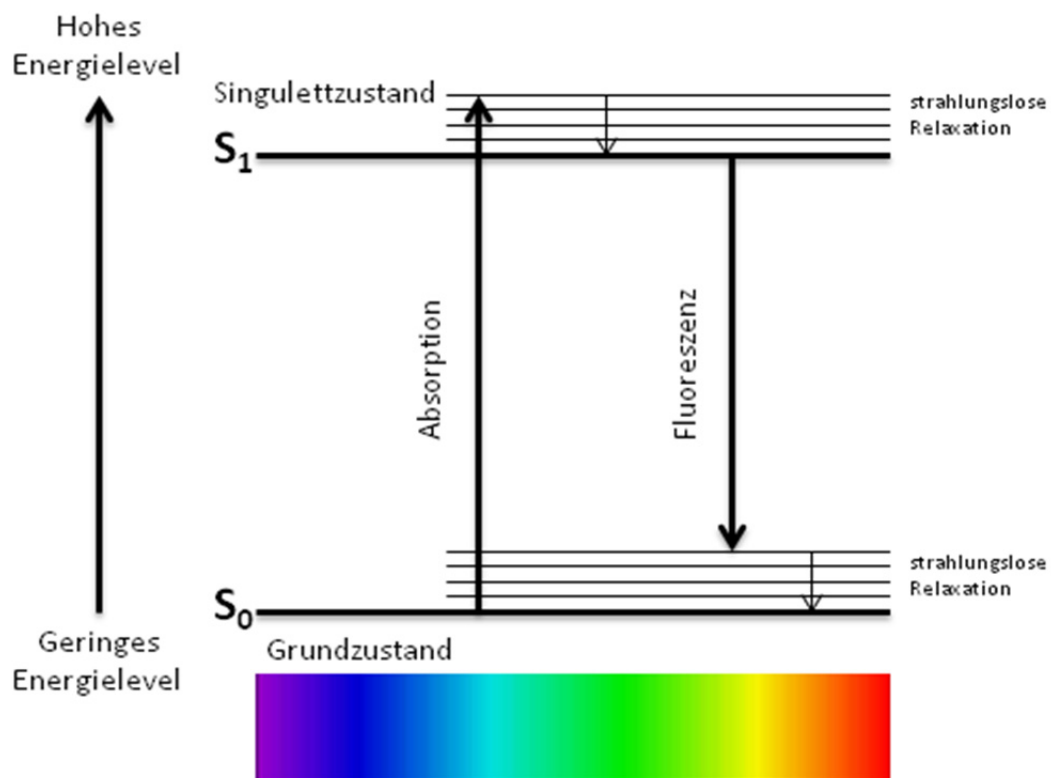
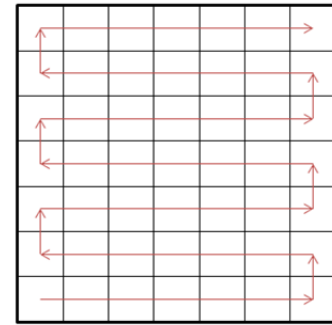
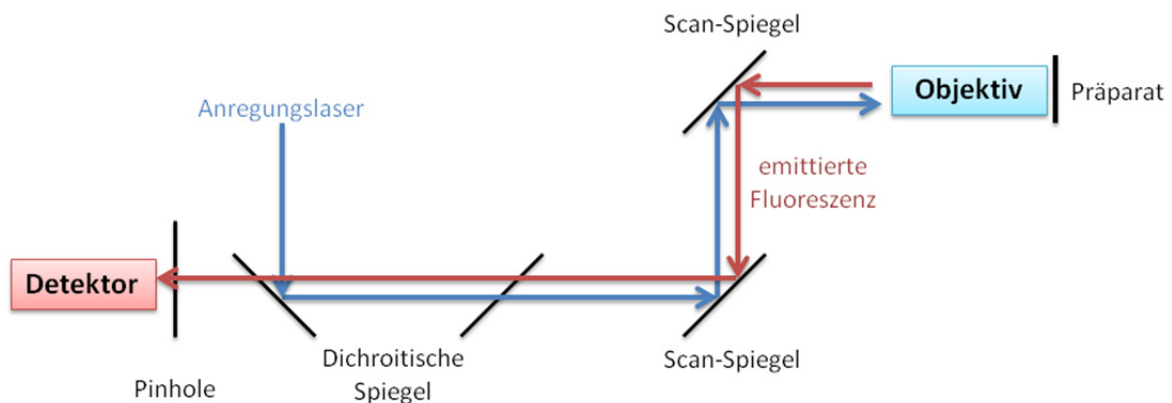


Abbildung 2.5: Anregung und Emission von Fluorophoren.

Bei herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie wird das gesamte Präparat auf einmal angeregt, und es werden auch Signale detektiert, die außerhalb der Fokusebene des Präparats liegen. Es wird so eine Abbildung erzeugt, in der die dreidimensional detektierten Informationen in einer zweidimensionalen Ebene dargestellt werden. Der Vorteil eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops ist, dass das Präparat mit einem fokussierten Laserstrahl in einem Linienmuster punktuell angeregt wird (Abb. 2.6). Durch eine geeignete Öffnung des Pinholes vor dem Detektor im Strahlengang des emittierten Lichts (Abb. 2.7) werden Informationen oberhalb und unterhalb der Fokusebene (Z-Achsen Ausrichtung) der betrachteten Bereiche zurückgehalten. Nach und nach wird so die Fluoreszenz des gescannten Bereichs durch Verschiebung des Präparats, in Z-Achse, detektiert. Die Verarbeitung der Signale zu einem dreidimensionalen Bilderstapel ermöglicht eine räumliche Analyse des Präparats. Aufgrund der Lichtbeugung können mit dieser Methode nur Details in lateraler Ebene aufgelöst werden, die in etwa so groß sind, wie die halbe Wellenlänge des verwendeten Laserlichts (Auflösungsgrenze nach Abbe, 1873).



**Abbildung 2.6:** Raster-Schema des Mikroskops.



**Abbildung 2.7:** Strahlengang des Lichts im konfokalen Laser-Rastermikroskop.

### 2.13.2 Bildaufnahme am ‚Leica TCS SP 5‘

Das Mikroskop TCS SP 5 (Leica) wurde über die Software ‚Leica Application Suite Advanced Fluorescence‘ (LAS AF) gesteuert. Der Argon(Ar)-Ionen-Laser (488 nm) und der Helium/Neon(HeNe)-Laser (633 nm) wurden mit einer Ausgangsintensität von 25% verwendet. Die erstellten Präparate wurden mit der Kombination aus den Fluorophoren

Alexa488 und Alexa647 bzw. Atto647 gefärbt und mit den Wellenlängen  $\lambda = 488$  (25-35%; gain = 800) und  $\lambda = 633$  (2-5%; smart-gain = 100%) sequenziell (between frames) angeregt. Die prozentualen Angaben der Laserintensität beziehen sich auf die Ausgangsleistung von 25%. Das von Alexa488 emittierte Fluoreszenzsignal wurde mit dem PMT (Photomultiplier)-Detektor im dem Bereich von 500 - 555 nm, und das von Alexa647 bzw. Atto647 emittierte Fluoreszenzsignal wurde mit dem APD (Avalanche-Photodiode)-Detektor im Bereich von 647 - 694 nm detektiert. Die Raster-Geschwindigkeit, mit der die Präparate beleuchtet wurden, betrug 200 Hz (Line Average = 1; Frame Average: 2), und die Größe der Abbildungen hatte das Format 1024 x 1024 Pixel (XY-Ausrichtung). Als Objektive wurden das 63 x und das 100 x Öl-Objektiv mit dem Immersionsöl Type F (Leica, Wetzlar) verwendet. Die Öffnung des Pinholes am Mikroskop war bei beiden Objektiven auf  $AU = 1$  (Airy Unit) eingestellt. Die Pixelgröße der Bilder betrug je nach Zoomfaktor (1,00 – 10,00 x) 380 – 40 nm. Bei der Aufnahme von Bilderstapeln wurden 20 Bilder in Z-Richtung aufgenommen, die vom Deckglas über die gesamte Höhe der Zelle gleichmäßig aufgeteilt wurden (Scheibenhöhe 0,13 - 0,2  $\mu\text{m}$ ).

### 2.13.3 Erstellung von Zell-Präparaten

Je ein rundes Deckglas (1,5  $\mu\text{m}$ ) wurde in das Well einer 12-Well-Platte gelegt und für 20 min bei Raumtemperatur mit Vollmedium (5% FCS) inkubiert, damit sich eine Proteinschicht auf den Deckgläsern bildet und das Anwachsen der Zellen erleichtert wird. Die RLE-Zellen wurden dann mit einer Dichte von  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  ausgesät und mit 2 ml Vollmedium für 24 h im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Danach wurde das Vollmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit warmem DPBS gewaschen und für mindestens 18 weitere Stunden mit Serum-reduziertem Medium (0,5% FCS) inkubiert, um die Zellen auszuhungern. Jetzt wurden die Zellen mit Nanopartikeln belastet und für die vorgesehene Inkubationsdauer bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeiten mit Partikeln sowie alle Änderungen dieses Protokolls sind an entsprechender Stelle aufgeführt. Nach Beendigung der Belastungszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit warmem DPBS gewaschen. Für die kommenden Inkubationszeiten wurde die 12-Well Platte zwischen den Arbeitsschritten mit Aluminiumfolie abgedunkelt, um die Fluorophore der Nanopartikel und der folgenden Immunofärbungen vor Licht zu schützen. Zum Fixieren der Zellen wurden diese bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd (4% in DPBS; 1 ml/Well) für 20 min inkubiert und im Anschluss dreimal

mit DPBS gewaschen. Dann wurde Triton X-100 (0,2% in DPBS; 1 ml/Well) für 10 min zu den Zellen gegeben, um die Membran der Zellen zu permeabilisieren. Mit einer BSA (bovines Serum Albumin)-Lösung (5% in DPBS; 1 ml/Well) wurden die Proteine der Zellen dann für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler blockiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper (200 µl/Well; Verdünnungen siehe Kapitel 2.3.4.1) in einer BSA-Lösung (1% in DPBS; 1 ml/Well) zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (optional wurde die Inkubation über Nacht bei 4 °C durchgeführt). Nachdem die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen wurden, wurde der Sekundärantikörper (1:500; 500 µl/Well) in DPBS verdünnt zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (optional wurde die Inkubation über Nacht bei 4 °C durchgeführt). Der überschüssige und nicht gebundene Antikörper wurde dann mit drei DPBS-Waschschritten entfernt und die Deckgläser mit ca. 30 µl Mowiol (Rezept in Kapitel 2.14.4) auf einem Objektträger eingebettet. Zur Trocknung wurden die Objektträger über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei 46 °C im Trockenschrank gelegt. Bis zur Bildaufnahme am Laser-Raster-Mikroskop wurden die Objektträger abgedunkelt bei 4 °C gelagert.

#### **2.13.4 Einbett-Medium Mowiol**

Für das Erstellen von Einbett-Medium wurden 2,4 g Mowiol 4-88 unter Rühren in 6 g Glycerin gelöst. Mowiol ist ein teilweise hydrolysiertes Polyvinylalkohol mit einer hohen Klebkraft. Nach Zugabe von 6 ml destilliertem Wasser wurde die Lösung auf 45 °C erhitzt und über Nacht bis zur vollständigen Durchmischung gerührt. Dann wurden 12 ml Tris (0,2 M, pH 8-8,5) hinzugegeben und bei 53 °C für 2 Stunden stark gerührt. Zuletzt wurden 0,625 g 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan (DABCO) zugefügt und weitere 30 min gerührt. Die Zugabe von DABCO verhindert das Ausbleichen der gefärbten Proben. Die Lösung wurde dann für 15 min bei 2152 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.



## 2.14 EGF und SiNP im zellulären System

### 2.14.1 Markierung von EGF mittels Fluoreszenzfarbstoff

Um die Interaktionen von EGF mit den Nanopartikeln und deren Lokalisierung innerhalb von Zellen in mikroskopischen Analysen zu untersuchen, wurde humanes rekombinantes EGF (R&D Systems) mit dem Farbstoff Atto488 fluoreszenzmarkiert (Atto488 Labeling Kits, Sigma Aldrich, #38371) markiert. Dafür wurde, nach Anleitung des Herstellers, 0,5 mg EGF in 100 µl Bicarbonatpuffer gegeben und 0,15 mg Atto488 Farbstoff in 20 µl DMSO gelöst. Die beiden Lösungen wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler vermengt. Danach wurde eine Gelfiltrationssäule (Ausschlussgröße: 5 kDa) erst mit 10 ml Wasser, dann mit 15 ml Phosphatpuffer equilibriert und das EGF-Atto488-Gemisch mit 5 ml Phosphatpuffer aufgetrennt. Die erste eluierte farbige Fraktion enthielt das mit Farbstoff markierte EGF und wurde separat aufgefangen. Um das Verhältnis zwischen Protein und Farbstoff zu bestimmen wurden 50 µl einer 1:10 Verdünnung der EGF-Atto488-Lösung in eine 96-Well Platte gegeben und die Absorption bei 280 und 498 nm bestimmt.

### 2.14.2 Interaktion zwischen EGF und SiNP (Gelelektrophorese)

Mit den folgenden Szenarien wurden zwei Ansätze verfolgt, bei denen die Partikel nach Inkubation mit EGF zum einen durch Ultrafiltration abgetrennt und zum anderen durch Zentrifugation sedimentiert wurden.

**Szenario 1 ,Ultrafiltration‘:** In diesem Experiment wurden die Si15 und Si80 Partikel mit fluoreszenzmarkiertem EGF (EGF-L) zum einen in H<sub>2</sub>O und zum anderen in Serum-reduziertem Medium für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 14.000 x g durch eine Membran zentrifugiert, die eine Ausschlussgröße (MWCO; *engl.* molecular weight cut off) von 100 kDa hat (Macrosep advanced 100 kDa OMEGA; Pall Life Science). In einem Vorversuch wurde zuvor überprüft, dass die drei Partikelgrößen von dieser Membran zurückgehalten werden, indem die fluoreszierenden Partikel in den Filtraten mittels SDS-Gel nicht mehr detektiert werden konnten. Die Nanopartikel und das EGF-L wurden im gleichen Verhältnis, wie im Zellversuch, bzw. mit der gleichen Massenkonzentration der verschiedenen SiNP eingesetzt und die Filtrate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zunächst wurden Partikel und EGF-L in H<sub>2</sub>O (Gel A) und außerdem in Serum-reduziertem Medium inkubiert (Gel B1/B2). Für diesen Ansatz (,gleiche Masse‘) wurde EGF [100 ng/ml] mit

33 µg/ml SiNP in 2 ml H<sub>2</sub>O bzw. Serum-reduziertem Medium gegeben. Dadurch soll neben der EGF-Partikel Interaktion in Wasser auch die Interaktion in Anwesenheit von Serumproteinen und Medienbestandteilen, d.h. unter den gleichen Bedingungen wie im Zellexperiment, untersucht werden. Um zu überprüfen, ob die Bindung von EGF von der Oberfläche oder der Größe der Partikel abhängt, wurden auch Ansätze erstellt, bei denen die Si15 und Si80 Partikel mit der gleichen spezifischen Oberfläche, statt der gleichen Massenkonzentration, eingesetzt wurden. Die Oberflächen in dem Ansatz ‚gleiche Masse‘ betragen ungefähr 222,0 m<sup>2</sup>/g für die verwendeten Si15 Partikel und 41,6 m<sup>2</sup>/g für die verwendeten Si80 Partikel. Die spezifischen Oberflächen wurden mit einem linearen Regressionsmodell berechnet ( $y = 143,2 - 1,505x$ , mit  $y$  = spezifische Oberfläche [m<sup>2</sup>/g],  $x$  = Partikeldurchmesser [nm] und  $r^2 = 0,999$ ; Peuschel *et al.*, 2015). Zur Einstellung der spezifischen Oberfläche der Si80 Partikel auf die spezifische Oberfläche der Si15 Partikel (‚Oberfläche wie Si15‘) wurden 177,5 µg/ml der Si80 Partikel eingesetzt. Zur Einstellung der spezifischen Oberfläche der Si15 Partikel auf die spezifische Oberfläche der Si80 Partikel (‚Oberfläche wie Si80‘) wurden 6,2 µg/ml der Si15 verwendet. Als Kontrollen wurde EGF-L in H<sub>2</sub>O und in Serum-reduziertem Medium jeweils unfiltriert, sowie ohne SiNP filtriert, verwendet. Bis zur Gel-Elektrophorese wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

**Szenario 2 ‚Zentrifugation‘:** Im zweiten Szenario wurden die Partikel-EGF Gemische ohne Membran bei 16824 x g zentrifugiert, weil ein großer Teil des EGFs an der Membran adsorbiert. Unter diesen Bedingungen der Zentrifugation werden die Si80 Partikel quantitativ sedimentiert, während die Si15 Partikel für eine Sedimentation zu klein bzw. Trägheit, Reibung und Auftrieb zu groß sind, sodass sie im Überstand detektierbar bleiben. Die Si15 bzw. Si80 Partikel wurden in der Konzentration 33 µg/ml in 2 ml Serum-reduziertem Medium mit EGF-L [100 ng/ml] 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 30 min zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Gel-Elektrophorese bei -20 °C gelagert. Als Kontrollen wurde EGF-L ohne Partikel, Partikel ohne EGF-L und die nicht zentrifugierte Mischung aus Partikeln und EGF verwendet. Alle Kontrollen wurden zentrifugiert und nicht zentrifugiert auf das Gel aufgetragen.

### **Gel-Elektrophorese:**

Für die Elektrophorese wurde ein 16%-Acrylamidgel gegossen und die Gel-Taschen mit 35 µl Probe mit 5 µl 4 x konzentriertem Laemmli-Puffer gefüllt. Die Auftrennung der Proteine fand für 15 min bei 70 V im Sammelgel und 50-60 min bei 110 V im Trenngel statt. Direkt nach

der Elektrophorese wurden das fluoreszenzmarkierte EGF bzw. die fluoreszenzmarkierten Partikel mit dem Gel-Dokumentationssystem Furchem Q (Alpha Innere) unter Verwendung der Anregungswellenlängen 475 nm (Emissionsfilter 537 nm; für das EGF-L) und 632 nm (Emissionsfilter 699 nm; für die SiNP) detektiert.

**Tabelle 2.9:** Zusammensetzung des 16%-Acrylamidgels.

<b>Trenngel</b>	<b>Zusammensetzung</b>		<b>Sammelgel</b>
5,33 ml	37,5 :1, 30% AA; 0,8% BAA Acrylamid		1 ml
2 ml	Tris (pH 8,8) 1,875 M	Tris (pH 6,8) 0,6 M	0,75 ml
0,1 ml	SDS (10%)		0,075 ml
200 µl	APS (10%) [20 µg/ml]		150 µl
3,65 ml	H <sub>2</sub> O (Milli-Q)		5,65 ml

### 2.14.3 Interaktion zwischen EGF und SiNP (Fluoreszenz-Färbung)

Für diesen Versuch wurden RLE-Zellen in einer 12-Well Platte, wie unter Kapitel 2.14.3 beschrieben, ausplattiert und kultiviert. Die Zellen wurden für 5 min mit den Nanopartikeln Si15, Si25, Si80 und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle belastet. Als Wachstumsfaktor wurde das markierte EGF verwendet und kurz nach Zugabe der Partikel zu den Ansätzen gegeben. Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung des EGFs und der Nanopartikel waren in diesem Experiment keine weiteren Präparationsschritte bzw. Färbungen nötig und die Deckgläser wurden nach der Fixierung mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Bis zur Untersuchung der Proben mit einem konfokalen Mikroskop wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### 2.14.4 Interaktion zwischen dem EGFR und SiNP

Für diesen Versuch wurden RLE-Zellen in einer 12-Well Platte, wie unter Kapitel 2.14.3 beschrieben, ausplattiert und kultiviert. Die Zellen wurden für 5 min mit den Nanopartikeln Si15, Si25, Si80 und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle belastet. Nach der Blockierung der Zellen wurde dann der EGFR mit dem Primärantikörper (Kapitel 2.3.4.1) inkubiert und danach mit dem Sekundärantikörper Alexa488 angefärbt und fixiert. Bis zur Untersuchung der Proben mit einem konfokalen Mikroskop wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

## 2.15 Aufnahme von Silikananopartikel in RLE-Zellen

### 2.15.1 Aufnahmemechanismus

Die Internalisierung von Nanopartikeln durch RLE-Zellen wurde untersucht, indem Inhibitoren für Clathrin- und Caveolin-abhängige Aufnahmewege eingesetzt wurden. Dadurch sollte geprüft werden, durch welchen Mechanismus die Partikel in die Zellen gelangen. Für die Inhibierung des Clathrin-abhängigen Wegs wurde die Substanz Chlorpromazin (C) eingesetzt, welche die Bindung des AP-2 Adaptorkomplexes an die Membran und somit die Bindung von Clathrin verhindert. Die Caveolin-abhängige Aufnahme wurde durch Zugabe von Filipin III (F) inhibiert. Filipin interagiert mit Cholesterin und GPI-verankerten Proteinen aus Lipid Rafts, was in Anomalien der Caveolae resultiert und die Abschnürung der Caveolae verhindert.

In einem Vorversuch wurde die Zellmorphologie von adhären RLE-Zellen als Marker für die Toxizität der Inhibitoren überprüft. Dafür wurden in einer 12-Well Platte  $2 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  für 18 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Die Zellen wurden dann mit warmem DPBS gewaschen und mit 0,5% FCS-Medium für weitere 24 Stunden mit Serum-reduziertem Medium inkubiert. In das Serum-reduzierte Medium wurden die Inhibitoren in den Konzentrationen a) Chlorpromazin:  $50 \mu\text{M}$ ; b) Filipin:  $7 \mu\text{M}$ ; c) Chlorpromazin/Filipin:  $50 \mu\text{M}/7 \mu\text{M}$  gegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden wurden die Zellen mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss) auf morphologische Veränderungen, Adhärenz und Wachstumsverhalten optisch untersucht und repräsentative Bildaufnahmen von Befunden erstellt. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

In einer 12-Well-Platte wurden RLE-Zellen auf sterilen Deckgläsern, wie in Kapitel 2.14.3 beschrieben, kultiviert. In drei verschiedenen Ansätzen, a) Chlorpromazin ( $50 \mu\text{M}$ ); b) Filipin ( $7 \mu\text{M}$ ); c) Chlorpromazin und Filipin ( $50 \mu\text{M}/7 \mu\text{M}$ ); wurden die Clathrin- und Caveolin-abhängigen Aufnahmewege der Zellen inhibiert. Die Zugabe erfolgte eine halbe Stunde vor der jeweiligen Partikelinkubation mit Si15, Si25 und Si80; als Negativkontrolle wurde  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet. Nach 4 Stunden wurde das Medium mit den Partikeln verworfen und die Zellen mit warmem DPBS gewaschen und fixiert. Die Membran der Zellen wurde dann für 10 min mit AlexaFluor488-gekoppeltem WGA (1:500 in DPBS; *engl.* Wheat Germ Agglutinin) gefärbt und 3 x für je 5 min mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden für die WGA-Färbung nicht permeabilisiert oder blockiert und direkt mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Die

Proben wurden bei 4 °C bis zur Analyse am konfokalen Mikroskop SP5 gelagert. Für die Auswertung wurde ein lateraler Stapel einer ganzen Zelle in Z-Achse erstellt und in orthogonale Darstellungen der Stapel in YZ- oder XZ-Ausrichtung mit der Software ImageJ umgewandelt.

### **2.15.2 Frühe Endosomen**

Es wurden, wie unter Kapitel 2.14.3 beschrieben, RLE-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit Serum-reduziertem Medium inkubiert. Die Inkubation mit SiNP (Si15, Si25 und Si80) und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle erfolgte für eine halbe Stunde bei 37 °C. Die Endosomen wurden mit dem EEA1-Antikörper (*engl.* early endosome antibody 1; Kapitel 2.3.4.1) und dem Sekundärintikörper Alexa488 (anti-mouse) gefärbt. Dann wurden die Deckgläser mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet und bis zur Bildaufnahme am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop bei 4 °C gelagert.

### **2.15.3 Späte Endosomen**

Für diesen Versuch wurden RLE-Zellen auf Deckgläsern kultiviert (siehe Kapitel 2.14.3) und für 18 Stunden mit Serum-reduziertem Medium inkubiert. Die Belastung mit Silikananopartikeln erfolgte in einem Vorversuch für 5, 30, 60 und 90 Minuten und in den Replikaten dieses Experiments für 60 Minuten. Die späten Endosomen wurden mit dem Primärintikörper Rab7 (*engl.* Ras-related protein; Kapitel 2.3.4.1) und dem Sekundärintikörper Alexa488 (anti-rabbit) gefärbt. Die Deckgläser wurden auf Objektträgern mit Mowiol eingebettet und bis zur Analyse am konfokalen Laser-Rastermikroskop bei 4 °C gelagert.

### **2.15.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SiNP auf RLE-Zellen**

$2 \times 10^4$  RLE-Zellen wurden auf sterilen Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert und für weitere 18 Stunden mit Serum-reduziertem Medium inkubiert (wie unter 2.10.2 beschrieben). Die Zellen wurden für 5 Minuten mit Silikananopartikeln belastet, mit warmem DPBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd (in DPBS) für 20 min fixiert. Dann wurden die Zellen dreimal

mit warmem Phosphatpuffer (Tabelle 2.10) gewaschen und mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe das Wasser aus den Zellen entfernt. Dafür wurden die Deckgläser jeweils für 10 min in 30%, 50%, 70%, 80%, 90% und 96% Ethanol (in destilliertem Wasser) auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal für 15 Minuten mit 99% Ethanol und einmal für 15 Minuten mit einer 1:1 (Volumen) Mischung aus 99% Ethanol und Hexamethyldisilazan (HMDS) gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen für 15 Minuten in reinem HMDS inkubiert und das HMDS bis auf einen dünnen Film entfernt. Über Nacht wurde das verbliebene HMDS unter dem Abzug entfernt und die Proben bis zur Analyse am Elektronenmikroskop im Exsikkator gelagert.

Bei dem verwendeten Mikroskop handelte es sich um das Gerät Quanta 400 FEG (Schottky-Emitter) der Firma FEI (Hillsboro, USA), mit dem die Proben unter geringem Vakuum (100 Pa) analysiert wurden. Die Proben wurden mit einer Beschleunigungsspannung zwischen 5 und 10 kV angeregt und die Sekundärelektronen (SE) und Rückstreuielektronen (BSE) detektiert. Die weiteren verwendeten Einstellungen und Bildparameter sind in den jeweiligen Figurenlegenden angegeben. Die SE wurden mit dem ‚Large Field‘ Detektor (LFD) aufgenommen, und für die BSE wurde der Solid State Detektor (SSD) verwendet. Die Bilder haben eine Größe von 1024 x 884 Pixel.

**Tabelle 2.10:** Zusammensetzung des Phosphatpuffers.

<b>Phosphatpuffer</b> (pH 7,4; 400-450 mosmol/kg)	0,02 M Natrium-Dihydrogenphosphat Dihydrat (3,12 g/l) 0,1 M Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (17,20 g/l)
--	--

## 2.16 Statistik

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Triplikate (n=3) durchgeführt. Die Balkendiagramme der Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel als Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler ( $\sigma(\bar{X})$ ) erstellt.

**Formel 1:** Mittelwert.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

**Formel 2:** Standardfehler.

$$\sigma(\bar{X}) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Die Datenbewertung aller Versuche erfolgte über eine einseitige ANOVA (*engl.* analysis of variance). Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Effekte der Behandlungsgruppen signifikant voneinander unterscheiden.

Anschließend an die ANOVA wurden für alle Daten als PostHoc-Tests (zweiseitiger Bonferroni-Test, zweiseitiger Dunnett-Test oder Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Für die Post Hoc-Tests gilt das Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  als Grenze in einem 95% - Konfidenzintervall. Diese Analysen wurden mit *SPSS statistics 20/23* (IBM) durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

Die Exposition von Epithelien mit hydrophoben Kohlenstoffnanopartikeln führt zu einer redoxabhängigen Aktivierung des EGFR, die Einfluss auf die zelluläre Homöostase nimmt. Das Ziel der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation ist es aufzuklären, ob kolloidale Silikananopartikel (Si15, Si25, Si80) vergleichbare Effekte auf die Endpunkte Proliferation und Apoptose haben und ob der EGFR-Signalweg für die Ausprägung dieser Reaktionen verantwortlich ist. Dazu wurde als etabliertes epitheliales Zellkulturmodell die Zelllinie RLE-6TN (Rattenlungenepithel) gewählt. Zusätzlich wurden Mechanismen der Nanopartikel-Zell-Interaktion auf der Ebene der Internalisierung der SiNP in die Zellen und der Lokalisation in den Zellen aufgeklärt.

### 3.1 Zytotoxizität

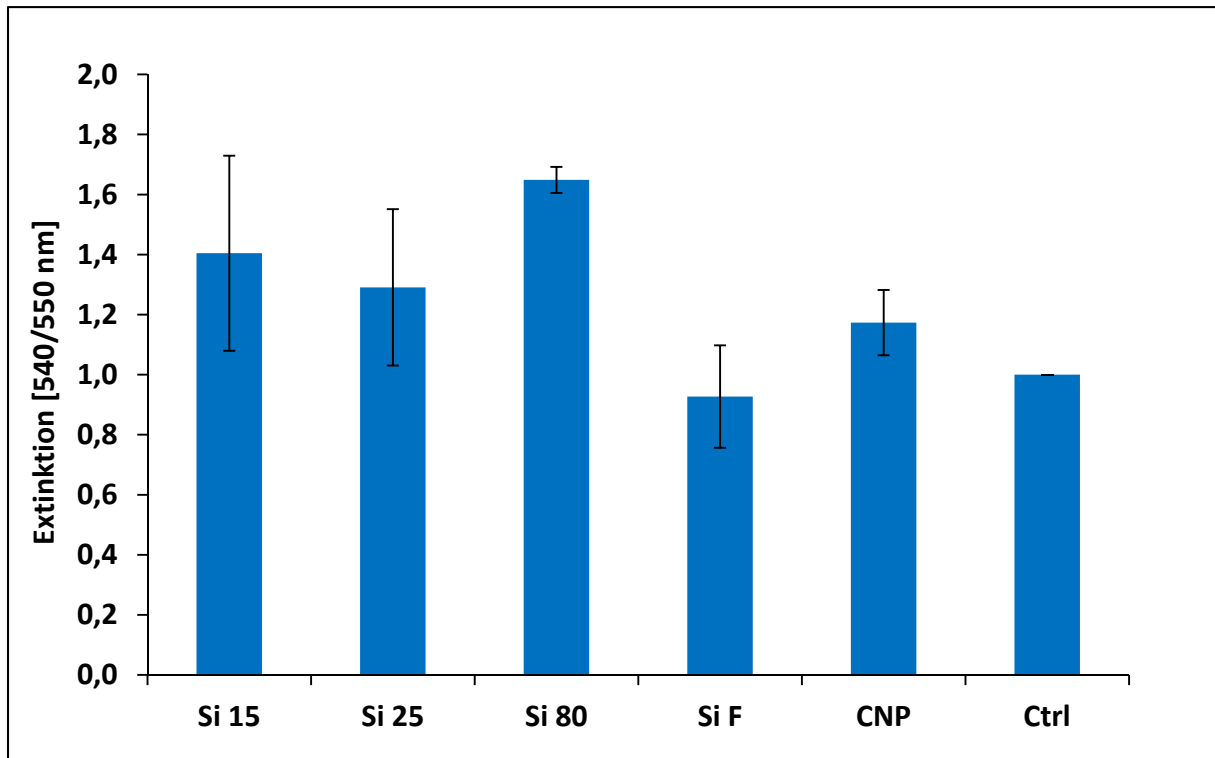
In Analogie zu den Vorarbeiten mit hydrophoben Nanopartikeln wurde für die Silikananopartikel eine Effektdosis von 33 µg/ml ausgewählt. Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Effekte auf unspezifische Zytotoxizität zurückzuführen sind, wurden verschiedene Parameter der Vitalität der Zellen erfasst. Während der Durchführung der Versuche wurden die Zellen stets vor und nach der Belastung mit Nanopartikeln mikroskopisch auf Morphologie, Wachstumsverhalten, Granularität der Zelleinschlüsse, Adhärenz und Konfluenz untersucht, weil die Zellen während der folgenden Experimente keiner Partikel-induzierten akuten Toxizität ausgesetzt sein sollten. Weiterhin wurden im Rahmen der Bestimmung der Proliferationsraten von Zellen (Kapitel 3.2) durch Trypanblaufärbung abgestorbene Zellen erfasst. Darüber hinaus wurden typische Zytotoxizitätsassays auf der Ebene von Lysosomen und metabolischer Aktivität der Zellen durchgeführt.

#### 3.1.1 Neutralrot Assay

Mit dem Neutralrot Assays wurde die Integrität der Lysosomen der Zellen 24 h nach Exposition erfasst. Die Zellen wurden einmalig mit Silikananopartikeln (Si15, Si25, Si80) bzw. den hydrophoben Vergleichspartikeln fumed Silika (SiF) und Kohlenstoffnanopartikeln (CNP) jeweils mit 33µg/ml behandelt. Im Vergleich zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle konnte im Neutralrot



Assay keine signifikante Reduktion der Neutralrotfärbung durch die kolloidalen Silikapartikel beobachtet werden (Abb. 3.1). Auch die Behandlung mit SiF und CNP hatte keine Reduktion des Farbstoffes zur Folge. Es konnte eine leichte Verstärkung des Signals nach Belastung mit den Partikeln Si15, Si25, Si80 und CNP beobachtet werden, die sich nicht mit einer erhöhten Viabilität der Zellen erklären lässt, denn die morphologischen Untersuchungen gaben keine Hinweise auf eine vermehrte Proliferation. Hier könnte jedoch auch ein Effekt der Partikel auf die Lysosomen vorliegen. Die Partikel könnten die Entstehung neuer Lysosomen induzieren, sodass die Gesamtmenge von Neutralrot pro Zelle erhöht wird. Des Weiteren wurde in der Literatur beschrieben, dass Partikel-induzierte Autophagie bei Zellen mit einer erhöhten lysosomalen Aktivität einhergeht (Kenzaoui *et al.*, 2012). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Partikel selbst mit der Messung interferieren. Da jedoch das Absorptionsspektrum von den Silikananopartikeln bei der Wellenlänge des Neutralrots kein Maximum hat, erscheint diese Erklärung unwahrscheinlich. Die gemessene Menge Neutralrot nach Belastung mit den fumed Silikapartikeln ist auf dem Niveau der Kontrolle. Von diesem Versuch wurden unabhängige Triplikate erstellt.



**Abbildung 3.1: Zytotoxizität von verschiedenen Nanopartikeln bestimmt mit dem Neutralrot-Aassay.** RLE-6TN Zellen wurden 24 h mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln inkubiert und die Mittelwerte und Standardfehler der Extinktionen von  $n=3$  (jeweils 8 Replikate) unabhängigen Versuchen aufgetragen. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **SiF:** fumed Silikapartikel; **CNP:** Kohlenstoffnanopartikel; **Ctrl:**  $\text{H}_2\text{O}$ .

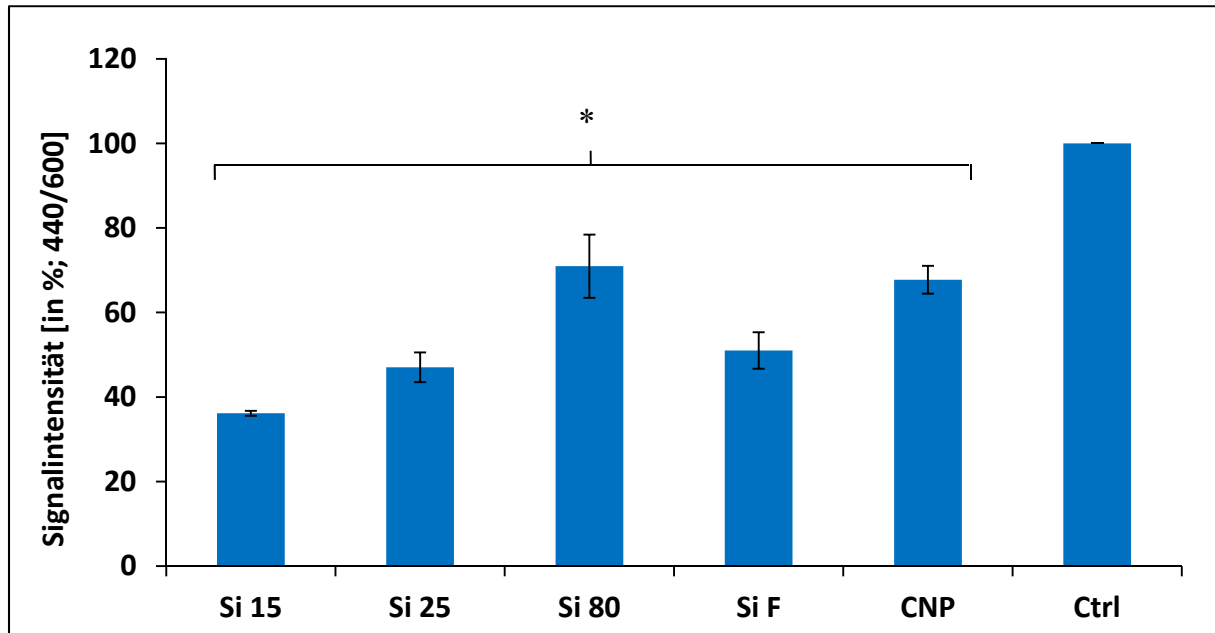
### 3.1.2 WST-1 Assay

Die Induktion von Signalereignissen durch Nanopartikel auf molekularer Ebene muss unter Serum-reduzierten Bedingungen bestimmt werden. In der Regel werden molekulare Veränderungen nach wenigen Minuten bis einigen Stunden erfasst. Um einen Eindruck der Wirkung von SiNP auf Zellen unter Serum-reduzierten Bedingungen zu bekommen, wurde die metabolische Aktivität der Zellen unter Serum-reduzierten Bedingungen 24 h nach einmaliger Exposition durchgeführt. Für dieses Experiment wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in einer 96-Well unter Serum-reduzierten Bedingungen kultiviert ( $n=3$ ). Die Belastung mit Nanopartikeln erfolgte pro  $n=1$  in fünffacher Bestimmung bei  $37^\circ\text{C}$  für 24 h. Als Kontrolle wurde 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) [1 M] zu den Zellen gegeben. Die gemessenen Farbintensitäten des gebildeten Formazansalzes der Nanopartikel wurden in ein prozentuales Verhältnis zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle (100%) und  $\text{NaN}_3$ -Behandlung (0%) gesetzt und in einem Balkendiagramm aufgetragen (Abb. 3.2.1). In einem weiteren Ansatz wurde das Experiment mit Vollmedium, unter nicht Serum-reduzierten Bedingungen, wiederholt.

Alle getesteten Partikel nehmen Einfluss auf die Umwandlung des Farbstoffes WST-1 bzw. verringern die Stoffwechselrate der RLE-Zellen. Statistische Analysen der Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ergaben für alle Partikel signifikant reduzierte Signalintensitäten (Bonferroni-Test) im Vergleich zur Kontrolle. Durch die kleinen kolloidalen Silikananopartikel wurde die metabolische Stoffwechselrate der RLE-Zellen größenabhängig am stärksten reduziert, wobei die kleinsten Partikel Si15 den größten Effekt mit über 60% Rückgang induzierten. Die Partikel Si25 verminderten die metabolische Stoffwechselrate um die Hälfte und die größten SiNP Si80 um etwa 30%. Die fumed Silikapartikel reduzierten die metabolische Leistung der Zellen um 50% und der Kohlenstoffpartikel (CNP) um etwa 35%. Der Wert der fumed Silikapartikel lag ungefähr auf dem Niveau der kolloidalen Silikapartikel Si25. In dem nicht Serum-reduzierten Ansatz (Abb. 3.2.2) konnte hingegen kein Effekt der Nanopartikel in der Konzentration  $33 \mu\text{g/ml}$  gemessen werden. Daher ist die Reduktion der metabolischen Aktivität im ersten Ansatz auf die Serum-reduzierten Bedingungen zurückzuführen.

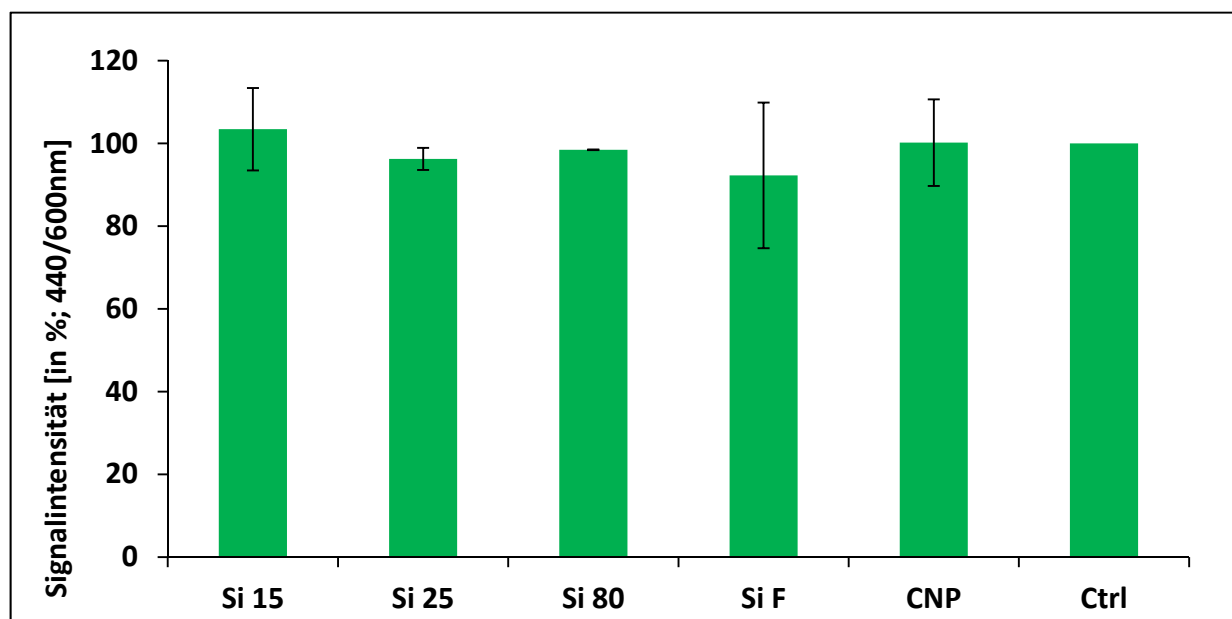
Dieser Assay gibt ausschließlich Auskunft über die Stoffwechselleistung von Zellen, jedoch konnte bei den mikroskopischen Analysen der Zellen nach 24 h keine Tendenz einer zytotoxischen Schädigung durch die Silikananopartikel beobachtet werden. Das lässt

vermuten, dass die SiNP nicht über einen zytotoxischen Effekt Einfluss auf den Metabolismus von RLE-Zellen nehmen.



**Abbildung 3.2.1: Zytotoxizität von verschiedenen Nanopartikeln bestimmt mit dem WST 1-Aassay unter Serum-reduzierten Bedingungen.** RLE-6TN Zellen wurden 24 h mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln inkubiert, die Signale der Partikel in ein prozentuales Verhältnis ( $\text{H}_2\text{O}$ : 100%;  $\text{NaN}_3$ : 0%) und die Mittelwerte und Standardfehler der Extinktionen von  $n=3$  unabhängigen Versuchen aufgetragen. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **SiF:** fumed Silika; **CNP:** Kohlenstoffnanopartikel; **Ctrl:**  $\text{H}_2\text{O}$  (100%).

\*Signifikanzniveau (Bonferroni-Test)  $p < 0,05$  im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle



**Abbildung 3.2.2: Zytotoxizität von verschiedenen Nanopartikeln bestimmt mit dem WST 1-Aassay unter nicht Serum-reduzierten Bedingungen.** RLE-6TN Zellen wurden 24 h mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln inkubiert, die Signale der Partikel in ein prozentuales Verhältnis ( $\text{H}_2\text{O}$ : 100%;  $\text{NaN}_3$ : 0%) und die Mittelwerte und Standardfehler der Extinktionen von  $n=3$  unabhängigen Versuchen aufgetragen. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **SiF:** fumed Silika; **CNP:** Kohlenstoffnanopartikel; **Ctrl:**  $\text{H}_2\text{O}$  (100%).

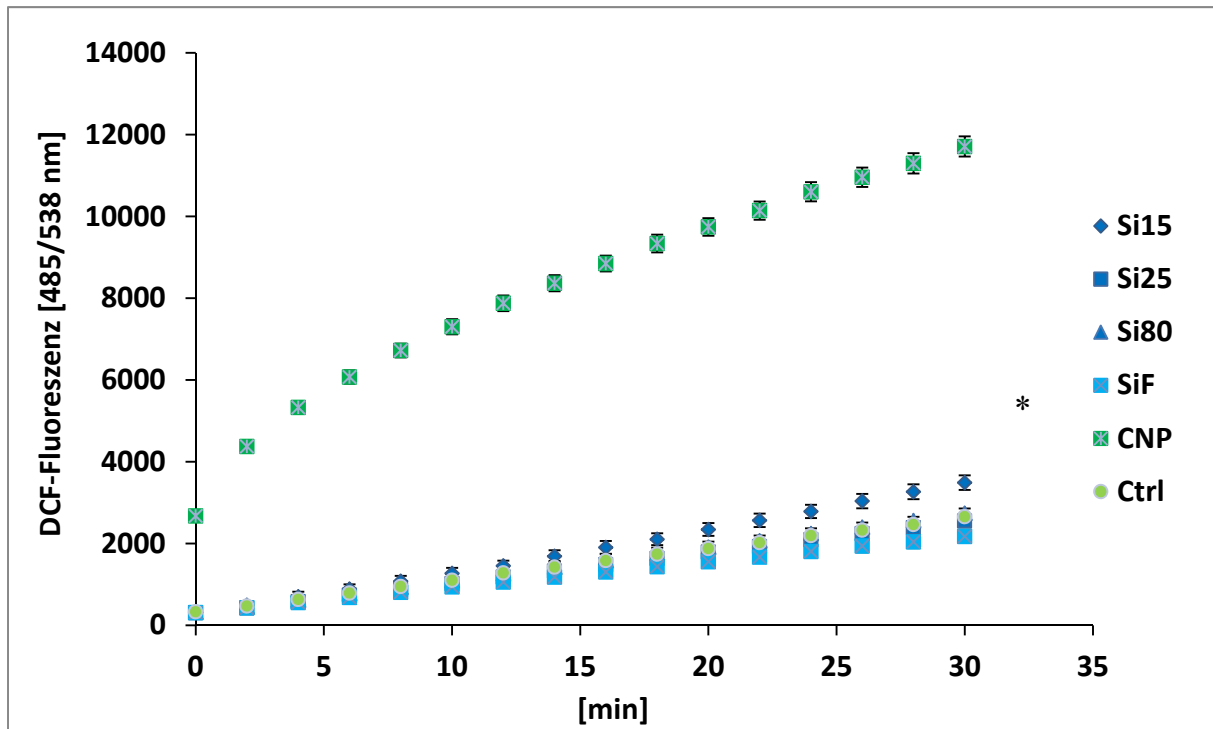
### 3.1.3 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Partikel wurde als Ursache für eine Partikel-induzierte Zytotoxizität identifiziert (Nordberga und Arnér, 2001; Hei *et al.*, 1998). Am Beispiel von Kohlenstoffnanopartikeln wurde gezeigt, dass intrazellulärer oxidativer Stress EGFR-abhängige Signaltransduktionsprozesse von Epithelzellen initialisieren (Sydlik *et al.*, 2006; Weissenberg *et al.*, 2010). Mit den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob kolloidale Silikananopartikel in einem zellfreien und einem zellulären System oxidativen Stress induzieren. DCF ist ein Farbstoff, der nach Oxidation durch reaktiven Sauerstoff fluoresziert.

#### 3.1.3.1 Zellfreier DCF-Assay

Mit dem zellfreien DCF-Assay kann das intrinsische oxidative Potential von Nanopartikeln, also die Fähigkeit von Nanopartikeln im Zellkulturmedium reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, untersucht werden. Zu den verschiedenen Ansätzen mit Serum-reduziertem Medium wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  [1  $\mu\text{M}$ ] zur Verstärkung von Fenton- (bzw. Haber-Weiss-) ähnlichen Reaktionen hinzugefügt und die DCF-Fluoreszenz als Marker der ROS-Entstehung alle 2 min über einen Zeitraum von 30 min gemessen (Abb. 3.3).

Die DCF-Fluoreszenz der als Positivkontrolle getesteten Kohlenstoffpartikel (CNP) waren vom Zeitpunkt  $t=0$  an im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht, und nach 30 min stieg ihr Wert auf das etwa 6-fache des Wertes der Negativkontrolle an. Statistische Analysen der CNP-induzierten ROS-Generierung nach 30 min ergaben einen signifikant höheren Wert im Vergleich zur partikelfreien Kontrolle. Die ROS-Levels der drei kolloidalen Silikapartikel und des fumed Silikapartikels waren etwa auf dem gleichen Niveau und unterschieden sich nach 30 min nicht signifikant von dem Niveau der Negativkontrolle. Das bedeutet, dass die Silikananopartikel in der eingesetzten Dosis von 33  $\mu\text{g/ml}$  mit den Bestandteilen des Mediums keine ROS generieren. Eine mögliche Entstehung von ROS in Anwesenheit von RLE-Zellen wurde im folgenden Versuch untersucht.



**Abbildung 3.3: ROS-Induzierung bestimmt mit dem zellfreien DCF Assay.** Nanopartikel wurden mit Medium und  $\text{H}_2\text{O}_2$  [ $1 \mu\text{M}$ ] für 30 min inkubiert und alle 2 min die Fluoreszenzintensität von DCF bestimmt. Mittelwerte und Standardfehler der Fluoreszenz von  $n=3$  unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **SiF:** fumed Silika; **CNP:** Kohlenstoffnanopartikel; **Ctrl:**  $\text{H}_2\text{O}$ .

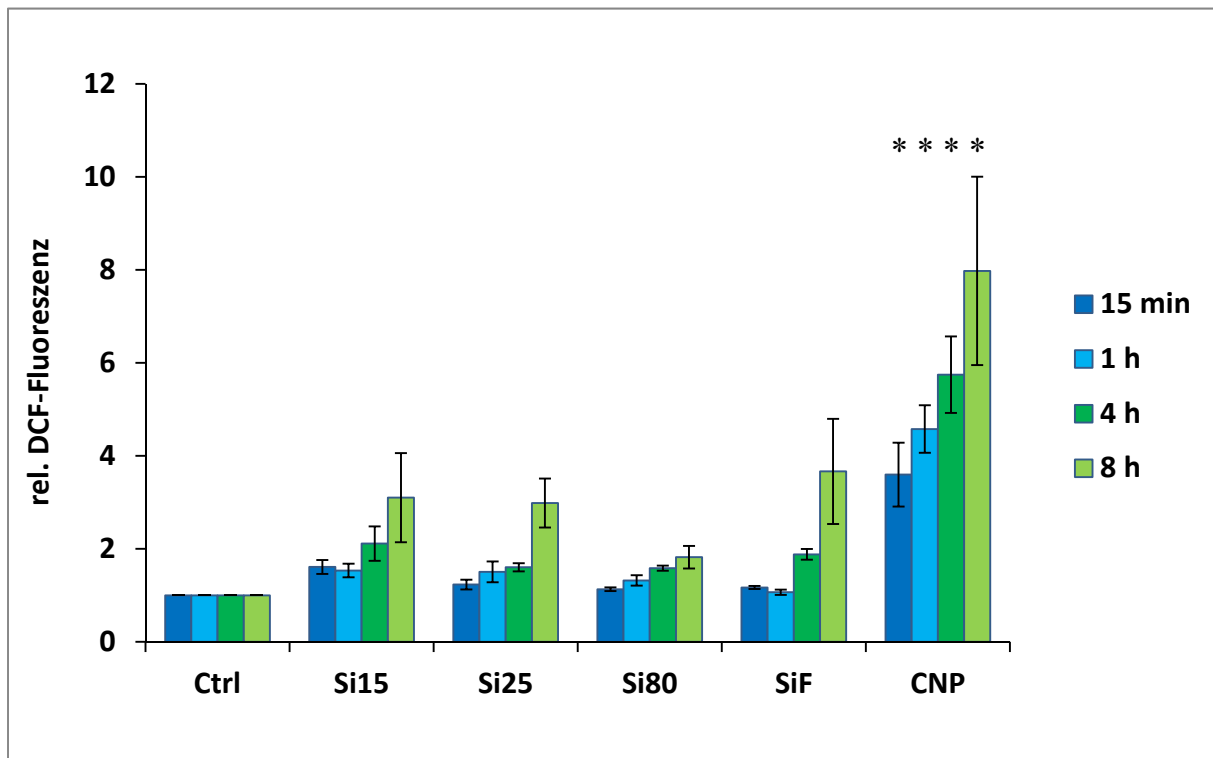
\*Signifikanzniveau (Bonferroni-Test)  $p < 0,05$  im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle nach 30 min

### 3.1.3.2 Zellbasierter DCF-Assay

Der zellbasierte DCF-Assay untersucht die intrazelluläre Generierung von ROS durch Nanopartikel in RLE-Zellen. Dazu wurden RLE Zellen mit Serum-reduziertem Medium kultiviert, mit Nanopartikeln belastet und mit DCF inkubiert. Nach den Zeitpunkten 15 min, 1 h, 4 h und 8 h wurde die Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.4).

Die Daten zeigten einen signifikanten Anstieg der intrazellulären ROS-Levels nach Belastung mit CNP für alle gewählten Zeitpunkte. Wie schon in dem zellfreien DCF-Assay gezeigt werden konnte, war nach kurzer Zeit eine CNP-induzierte ROS-Entstehung in den Zellen messbar, die nach 15 min etwa 3,5-fach erhöht war und nach 8 h Partikelbelastung auf das Achtfache im Vergleich zur Kontrolle anstieg. Zu allen Zeitpunkten war die DCF-Intensität nach Belastung mit den CNP signifikant zur Kontrolle erhöht (Bonferroni-Test). In den mit Silikananopartikeln behandelten Zellen lässt sich tendenziell ein schwacher Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit beobachten. In den statistischen Analysen ist jedoch für keinen der Ansätze ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten.

Der zellfreie und der zellabhängige DCF-Assay haben gezeigt, dass die SiNP nur geringfügig die ROS-Levels in dem hier untersuchten biologischen System erhöhen. Die Aktivierung von Signalkaskaden über ROS, wie es für Kohlenstoffpartikel publiziert wurde, ist laut dieser Versuche für die SiNP unwahrscheinlich.



**Abbildung 3.4: Intrazellulärer oxidativer Stress bestimmt mit dem zellabhängigem DCF Assay.** RLE-6TN Zellen wurden mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln inkubiert und die Fluoreszenzintensität von DCF nach 15 min, 1 h, 4 h und 8 h bestimmt. Mittelwerte und Standardfehler der Fluoreszenz von  $n=3$  unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. **Si15**, **Si25**, **Si80**: kolloidale Silikapartikel; **SiF**: fumed Silika; **CNP**: Kohlenstoffnanopartikel; **Ctrl**:  $\text{H}_2\text{O}$ .

\*Signifikanzniveau (Bonferroni-Test)  $p < 0,05$  im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle



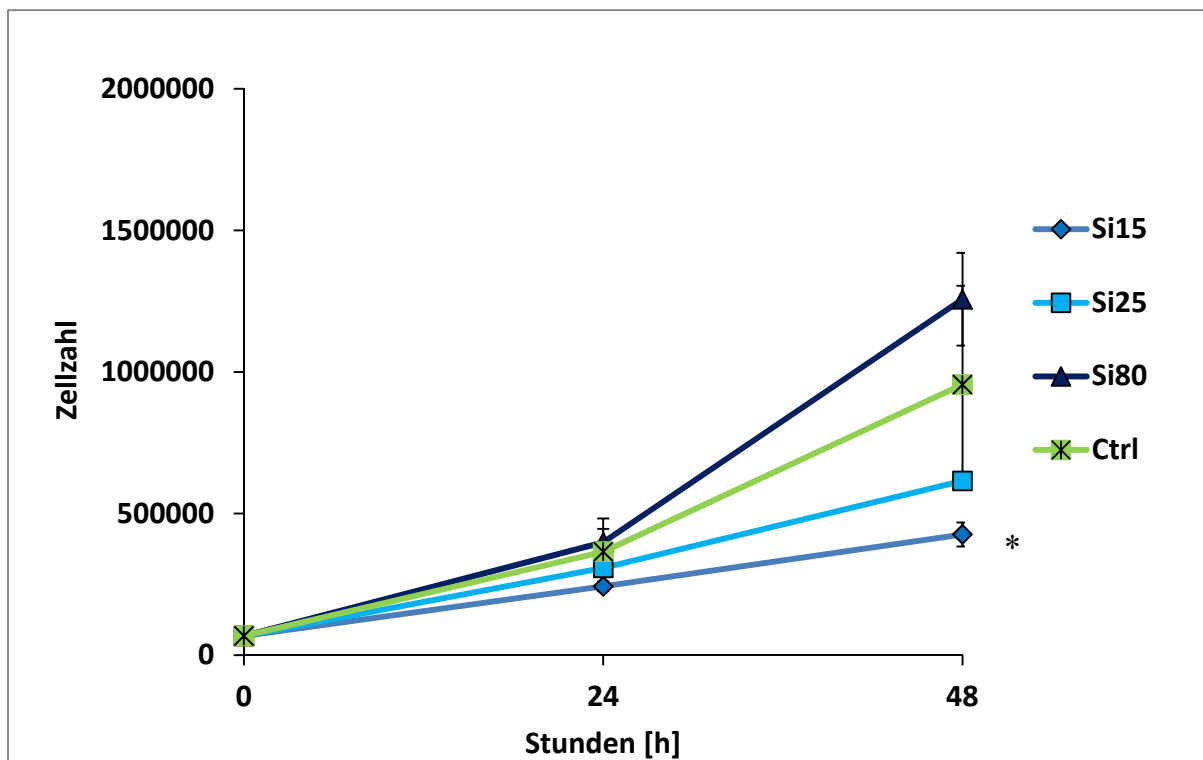
### 3.2 Proliferationsassay

Sowohl Zytotoxizität als auch die Interferenz von Nanopartikeln mit proliferativen Signalwegen können auf der Ebene des Zellwachstums Effekte auslösen. Es sollte deshalb geklärt werden, inwieweit die Partikel einen Einfluss auf die Proliferation von RLE-Zellen haben. Für den folgenden Versuch wurden  $1,8 \times 10^4$  RLE-Zellen pro  $\text{cm}^2$  für 24 h kultiviert und dann für weitere 24 h bzw. 48 h mit den kolloidalen Silikapartikeln belastet. Eine mikroskopische Auszählung der Zellzahlen erfolgte nach einer Färbung der Zellen mit Trypanblau mittels einer Neubauer-Zählkammer. Durch die Färbung mit Trypanblau wurde neben der Bestimmung der Zellzahl auch die Membranintegrität überprüft, da der Farbstoff nur von Zellen mit geschädigter Membran aufgenommen werden kann und von intakten Membranen ausgeschlossen bleibt. Bei der mikroskopischen Analyse der Zellen konnte durch die kolloidalen Silikapartikel Si15, Si25 und Si80 keine Veränderung der Membranintegrität nach 48 h Belastungszeit im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Im Mittel lag der Anteil der abgestorbenen Zellen bei etwa 2%.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden keine Effekte der Partikel auf die Zellen sichtbar. Nach 48 h Partikelbelastung waren die Messwerte der mit Si80 Partikeln belasteten Zellen höher als die Messwerte der Kontrolle (Abb. 3.5.1; dunkelblaue Linie) und die Zellzahlen nach Inkubation mit den beiden kleineren Silikapartikel hingegen waren im Vergleich zur Kontrolle niedriger. Die Zellzahl nach Belastung mit dem kleinsten Partikel Si15 (mittelblaue Linie) unterschied sich dabei signifikant von den Zellzahlen in den nicht exponierten Ansätzen. Die Si25 Partikel (hellblaue Linie) reduzierten die Wachstumsrate der Zellen nicht signifikant.

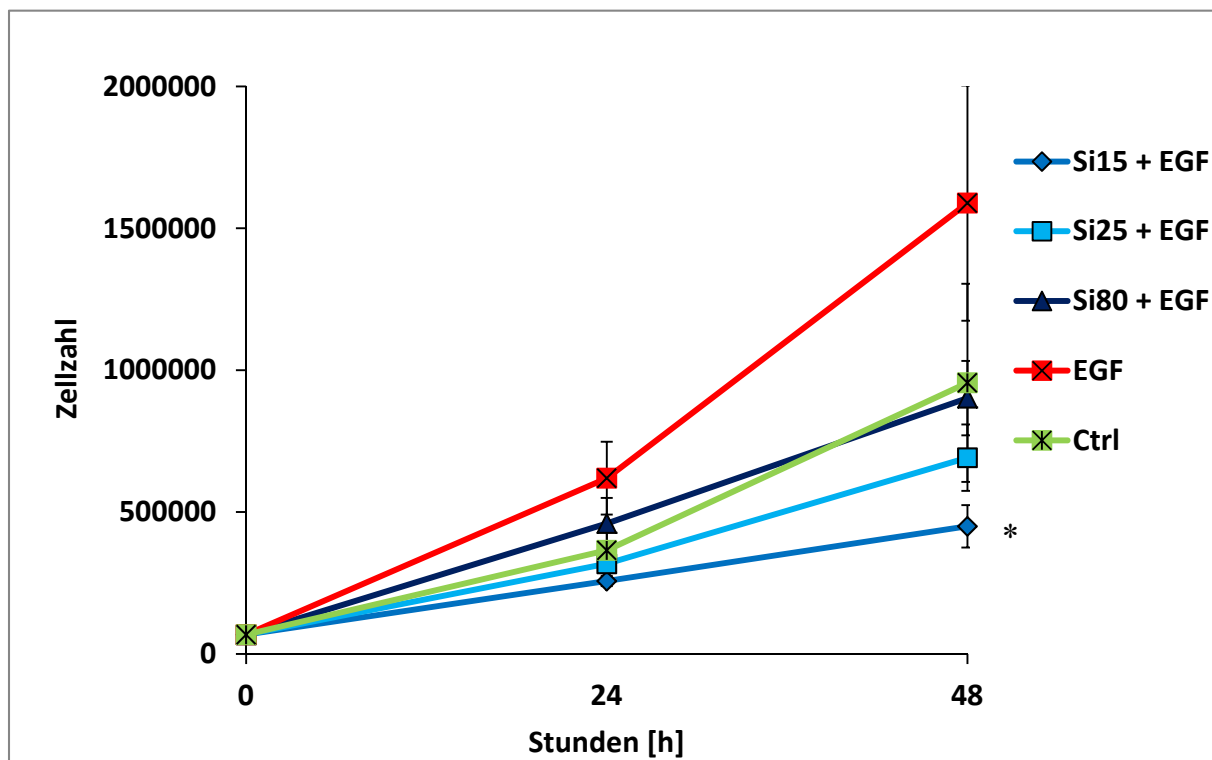
In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der oben gezeigte Effekt der Partikel spezifisch auf die EGFR-abhängige Regulation der Proliferation Einfluss nimmt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Partikel mit diesem Signalweg interferieren. Dazu wurde zu den RLE-Zellen direkt nach der Partikelbelastung auch EGF in einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben und wiederum die Zellzahlen nach 24 h und 48 h bestimmt. Die Daten des zweiten Experiments (Abb. 3.5.2) zeigten für die EGF-Kontrolle (rote Linie) einen starken Anstieg der Zellzahl auf etwa das Doppelte der Negativkontrolle (grüne Linie). Jedoch hatte die zusätzliche Inkubation der Zellen mit EGF bei Partikelbelastung (Si15 und Si25) keinen proliferativen Einfluss auf die Zellen. Die Zellzahlen der Ansätze mit den beiden kleineren Silikapartikeln (Si15 und Si25) waren auf denselben Niveaus wie bei dem

Experiment ohne EGF-Zugabe und auch nur die Si15 Partikel verminderten die Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Das bedeutet, dass eine Zugabe von EGF nach einer Partikelzugabe (Si15 und Si25) zu keiner Stimulation bei den RLE-Zellen führte.



**Abbildung 3.5.1: Proliferation von RLE-Zellen in Anwesenheit von SiNP.** RLE-Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln (SiNP) belastet, mit Trypanblau gefärbt und am Mikroskop ausgezählt. Mittelwerte und Standardfehler der Lebendzellzahlen von  $n=3$  unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. Si15, Si25, Si80: kolloidale Silikapartikel; Ctrl:  $\text{H}_2\text{O}$ .

\*Signifikanzniveau (Dunnett-Test)  $p < 0,05$  im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle



**Abbildung 3.5.2: Proliferation von RLE-Zellen in Anwesenheit von SiNP und EGF.** RLE-Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln (SiNP) und EGF [100 ng/ml] belastet, mit Trypanblau gefärbt und am Mikroskop ausgezählt. Mittelwerte und Standardfehler der Lebendzellzahlen von  $n=3$  unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. Si15, Si25, Si80: kolloidale Silikapartikel; Ctrl:  $\text{H}_2\text{O}$ .

\*Signifikanzniveau (Dunnett-Test)  $p < 0,05$  im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle

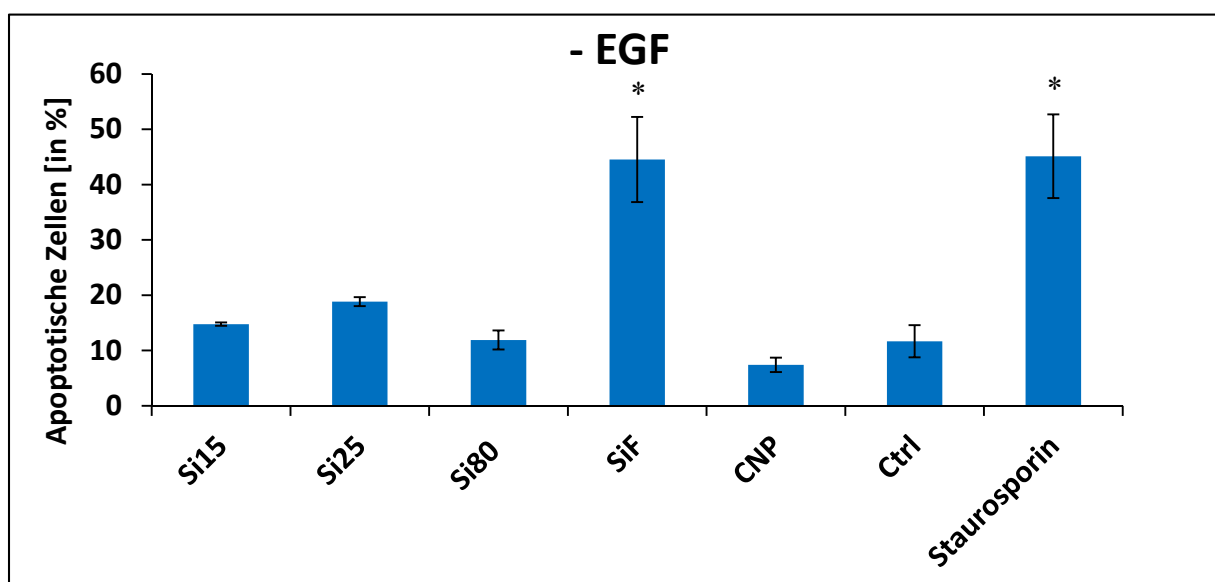
### 3.3 Apoptose/Nekrose Assay

Die bislang erhobenen Daten weisen darauf hin, dass kolloidale Silikananopartikel keinerlei zytotoxische Wirkung und nur ein geringes Potential zu Induktion von oxidativem Stress haben. Dennoch sind sie, insbesondere Si15, dazu in der Lage, die Zellzahlen im Proliferationsassay signifikant zu reduzieren. Neben einer direkten Zellschädigung können Nanopartikel zur Auslösung von programmiertem Zelltod (Apoptose) beitragen (Sydlik et al., 2006). Die beobachtete Reduktion der Proliferationsrate durch Silikananopartikel könnte also theoretisch durch Nanopartikel-induzierte Apoptose bedingt sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Apoptoseraten nach Partikelexposition in RLE-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. AnnexinV bindet an das Phospholipid Phosphatidylserin, das nur in apoptotischen Zellen von der inneren Seite der Membran nach außen befördert wird. Propidiumiodid (PI) kann nur in Zellen mit geschädigter Membran (nekrotische Zellen) oder spät-apoptotischen Zellen eindringen. Bei der Auswertung dieses Versuches konnten so AnnexinV-positive Zellen (Apoptose) von AnnexinV- und PI-positiven Zellen (Nekrose) unterschieden werden, während nicht nekrotische bzw. apoptotische Zellen ungefärbt blieben. (Vermes *et al.*, 1995; Zamai *et al.*, 1996). Der zeitliche Verlauf von Apoptose wird zwischen frühen und späten Stadien von Apoptose unterschieden. Bei der Auswertung dieses Assays wurden alle apoptotischen und nekrotischen Signale zusammengeführt, da nur wenige nekrotische Zellen detektiert wurden (Abb. 2.4) und auch in den zytotoxischen Assays kein Hinweis auf Partikel-induzierte Nekrose gefunden wurde. Mit dem folgendem Experiment sollte überprüft werden, ob der wachstumshemmende Effekt der Si15 Partikel durch Partikel-induzierten Zelltod hervorgerufen wurde.

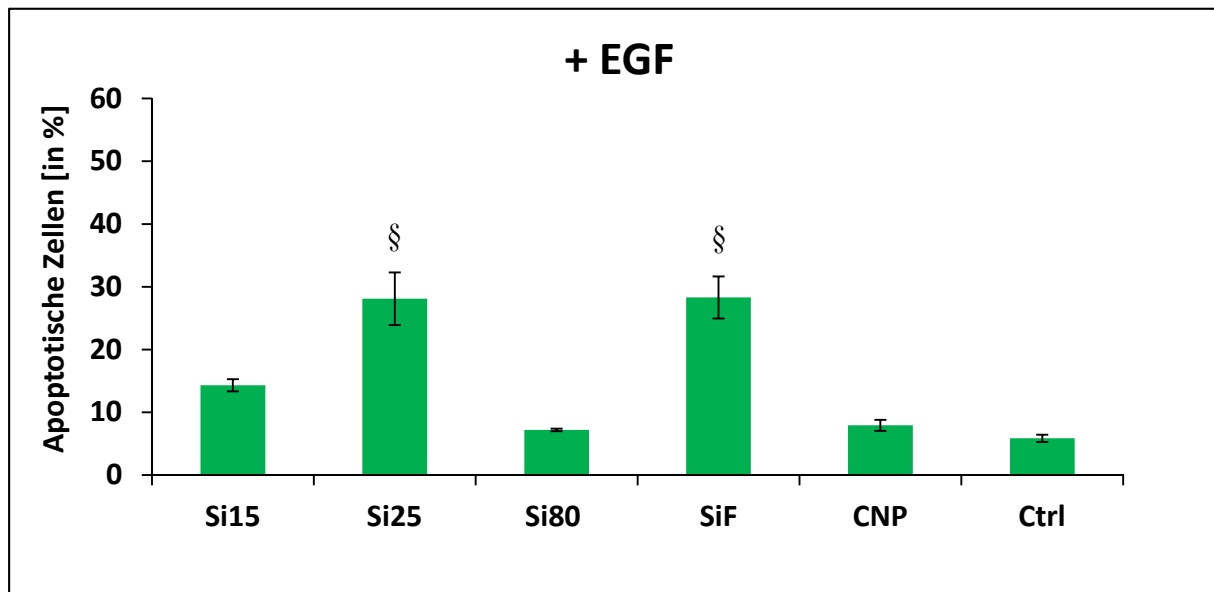
Für dieses Experiment wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 6-Wells ausplattiert und mit Silikananopartikeln für 24 h belastet. Mit der Zugabe von EGF wurde kontrolliert, ob eine mögliche Induktion von Apoptose oder Nekrose kompensiert werden kann. Die Analyse der mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbten Zellen wurde mithilfe eines Durchflusszytometers (FACS) durchgeführt und die Ereignisse früher/später Apoptose und Nekrose prozentual bestimmt. Die kolloidalen Silikananopartikel zeigten im Versuchsansatz nach 48 h Belastungszeit ohne EGF keine Erhöhung des Zelltodes durch Apoptose oder Nekrose (Abb. 3.6.1, oben), wohingegen die fumed Silikapartikel eine deutliche Erhöhung von Apoptose/Nekrose im Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle auslösten (50%). Die zusätzliche Gabe von EGF führte für einzelne Ansätze zu geringen Veränderungen der Befunde (Abb. 3.6.1, unten). So war die Sterberate der nicht mit Partikel behandelten Zellen durch die

Zugabe von EGF um ca. ein Drittel reduziert. Im Vergleich dazu konnte eine signifikante Erhöhung der Sterberate der mit Si25 Partikeln behandelten Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt konnte für die anderen kolloidalen Partikel – insbesondere für die Si15 Partikel, die sehr effektiv die Proliferation inhibieren – nicht beobachtet werden. Die apoptotische/nekrotische Wirkung von fumed Silikapartikeln konnte durch die Zugabe von EGF reduziert werden.

Dieses Ergebnis schließt aus, dass die verminderte Proliferationsrate der RLE-Zellen bei Inkubation mit den beiden kleinen Silikapartikeln durch Apoptose oder Nekrose zu erklären ist. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die SiNP-induzierte Reduzierung der Proliferation Auswirkungen auf EGFR-abhängige Signaltransduktionsereignisse hat.



→



**Abbildung3.6.1: Frühe und späte Apoptose/Nekrose.** RLE-Zellen wurden für 48 Stunden mit 33 µg/ml Nanopartikeln und Staurosporin [0,3 µM] bzw. mit Nanopartikeln und EGF [100 ng/ml] belastet. Mittelwerte und Standardfehler der prozentualen frühen und späten apoptotischen Ereignisse von n=3 unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **SiF:** fumed Silika; **CNP:** Kohlenstoffnanopartikel; **Ctrl:** H<sub>2</sub>O.

\* **Signifikanzniveau zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle (Bonferroni-Test) p < 0,05**

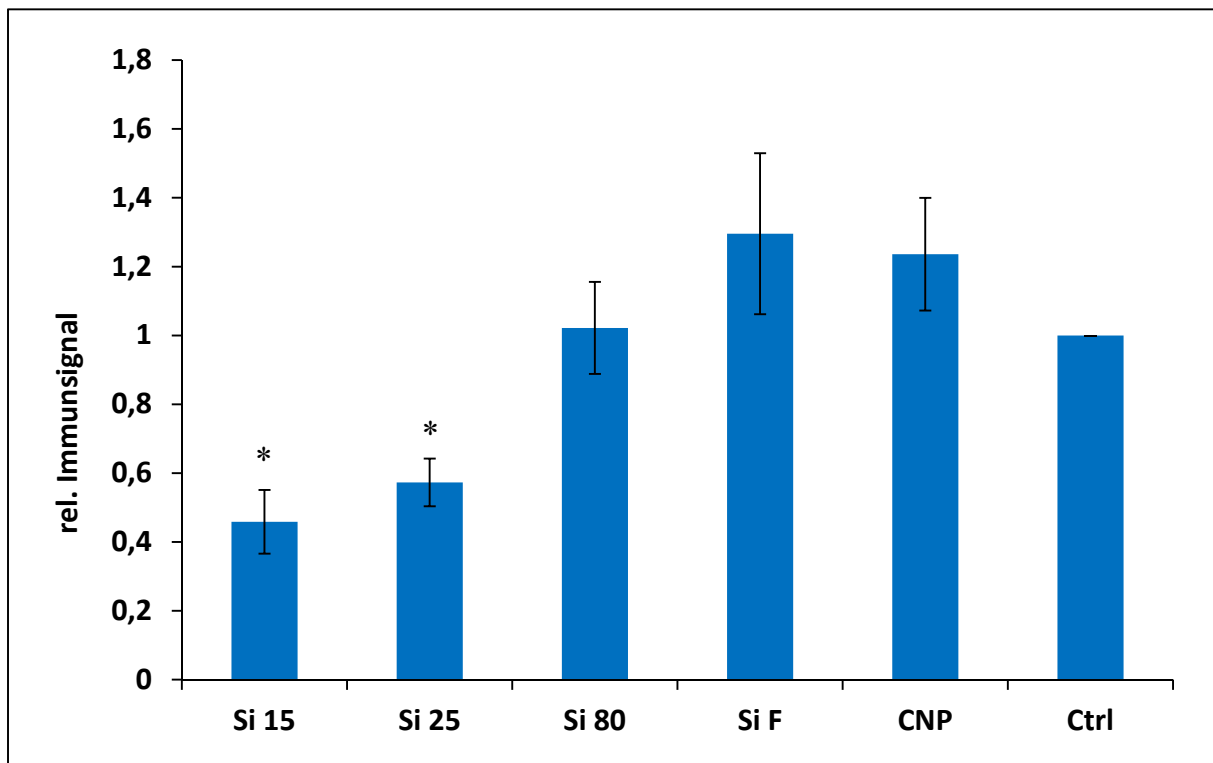
§ **Signifikanzniveau zur EGF-Kontrolle (Bonferroni-Test) p < 0,05**

### 3.4 Phosphorylierung des EGFR (Western Blot)

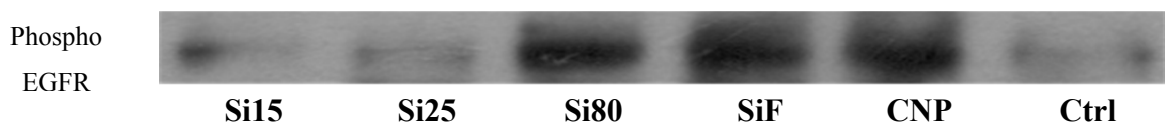
Die Inhibierung der EGF-spezifischen Proliferation durch die kolloidalen Silikapartikel weist darauf hin, dass dieser Effekt über den EGFR-Signalweg gesteuert wird. Der initiale Schritt dieser Signaltransduktion ist die Aktivierung des EGF-Rezeptors. Wenn der EGFR an seinen Liganden EGF bindet, dimerisiert dieser und wird an seiner intrazellulären Domäne phosphoryliert. Diese Phosphorylierung aktiviert weitere Kinasen, wie Erk 1/2 oder Akt (Brand *et al.*, 2011), die mit den nächsten Experimenten untersucht werden. Im folgenden Versuch wurden die Phosphorylierungsniveaus des EGFRs bestimmt, indem die Proteine von RLE-Zellen nach Partikelinkubation durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und durch Phosphorylierungs-spezifische Antikörper detektiert wurden. Es wurde die Phosphorylierungsstelle des EGFRs Tyr1173, die durch den EGFR selber phosphoryliert werden kann, ausgewählt. Die Autophosphorylierung dieser Stelle wird spezifisch durch die Bindung eines Liganden (z.B. EGF) vermittelt (Abe *et al.*, 2006; Mitsudomi und Yatabe,

2010; Nyati *et al.*, 2006; Biscardi *et al.*, 1999; Stover *et al.*, 1995). Außerdem wurde als interne Kontrolle die Gesamtmenge an EGFR durch Verwendung eines Phosphorylierungs-unspezifischen Antikörpers für die Gesamtmenge des EGFRs aus denselben Proben bestimmt und mit den Signalen der Phosphorylierungs-Antikörper verrechnet.

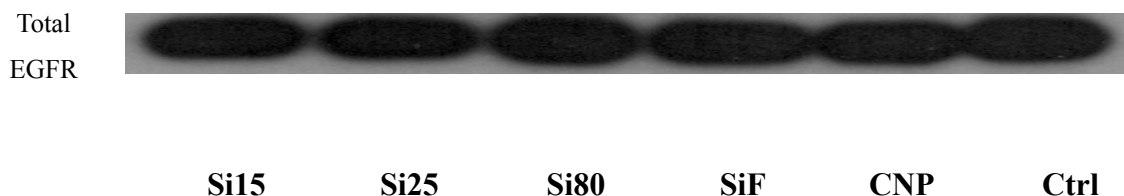
Für diesen Versuch wurden die RLE-Zellen mit Serum-reduziertem Medium, ohne weitere EGF-Zugabe, kultiviert, weil mit nicht kolloidalen Nanopartikeln eine Aktivierung des EGFRs unter diesen Bedingungen gezeigt werden konnte (Sydlik *et al.*, 2006; Weissenberg *et al.*, 2010). Anhand der repräsentativen Autoradiographie der Western Blots sieht man die Signalintensität des phosphorylierten EGFR (Abb. 3.7.2). Die beiden kleinen kolloidalen Silikapartikel Si15 und Si25 reduzierten die Phosphorylierung des EGFRs nach 5 min Inkubation an der Phosphorylierungsstelle Tyr1173. Die Signale des großen kolloidalen Silikapartikels Si80 lagen in etwa auf Kontrollniveau, während die fumed Silikapartikel sowie die Kohlenstoffpartikel die Phosphorylierungslevels im Vergleich zu der Kontrolle verstärkten. Die gemessenen Signale wurden nach der Quantifizierung mit Signalen des Gesamt-EGFR derselben Proben normiert. Die quantitative Auswertung der Triplikate von Tyr1173 (Abbildungen 3.7.1) zeigte, dass die Verminderung der Phosphorylierung, die durch die Partikel Si15 und Si25 induziert wurden, signifikant kleiner im Vergleich zur Kontrolle war (unabhängige Mann-Whitney-U-Tests). Die Signalstärke von phosphoryliertem EGFR nach Partikelbelastung mit Si80 Partikeln war auch nach der Normierung in etwa auf dem Level der Kontrolle und die Partikel SiF und CNP aktivieren den EGFR im Vergleich zur Kontrolle, was von den schwer dispergierbaren Partikeln aufgrund der Ergebnisse anderer Studien erwartet wurde. Unter den Abbildungen 3.7.2 und 3.7.3 sind repräsentative Autoradiographien der Western Blots ausgeführt.



**Abbildung 3.7.1: Relative Phosphorylierungslevel des EGFR.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln belastet. Mittelwerte und Standardfehler der normierten Phosphorylierungssignale von  $n=3$  unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **SiF:** fumed Silika; **CNP:** Kohlenstoffnanopartikel; **Ctrl:**  $\text{H}_2\text{O}$ . Signifikanzniveau (Mann-Whitney-U-Test)  $p < 0,05$ .



**Abbildung 3.7.2: Repräsentative Abbildungen der Autoradiographien (Tyr1173).** RLE-Zellen wurden für 5 min mit Nanopartikeln belastet und die phosphorylierte Form des EGFR mittels Western Blot nachgewiesen.



**Abbildung 3.7.3: Repräsentative Abbildungen der Autoradiographien (gesamte EGFR-Fraktion).** RLE-Zellen wurden für 5 min mit Nanopartikeln belastet und der EGFR mittels Western Blot nachgewiesen.

### 3.5 Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt

Die Aktivierung des EGFRs durch den Liganden EGF kann verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, die am Ende eine Genregulierung im Nukleus initialisieren. Eine mögliche Signaltransduktion ‚downstream‘ des EGFRs ist zum einen die Aktivierung der



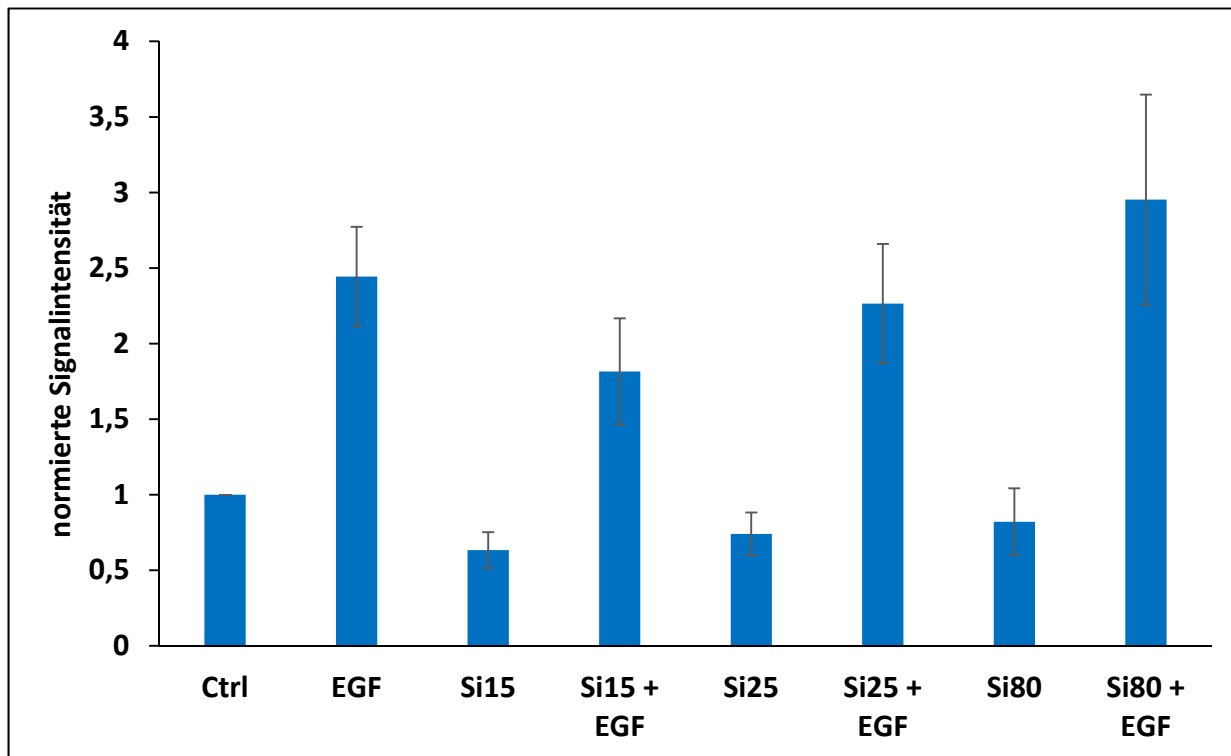
MAPK Erk 1/2 über die Proteine Ras, Raf und MEK und zum anderen eine PI3K/PIP3-vermittelte Aktivierung von Akt (Finkbeiner und Greenberg, 1996; Dikic *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1999). In den folgenden Experimenten sollte zunächst geklärt werden, ob die Reduktion des Phosphorylierungslevels des EGFRs, die durch die kolloidalen Silikapartikel induziert wird, einen unmittelbaren Einfluss auf die zentralen Signalproteine Erk 1/2 sowie Akt hat. Deshalb wurde die Phosphorylierung beider Kinasen zu einem frühen Zeitpunkt in Western Blot Experimenten untersucht. Um nachgeschaltete Effekte der EGFR Aktivierung zeitversetzt detektieren zu können, wurden Signalereignisse 30 Minuten nach der 5-minütigen Partikel-Inkubation erfasst.

### 3.5.1 Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt (Western Blot)

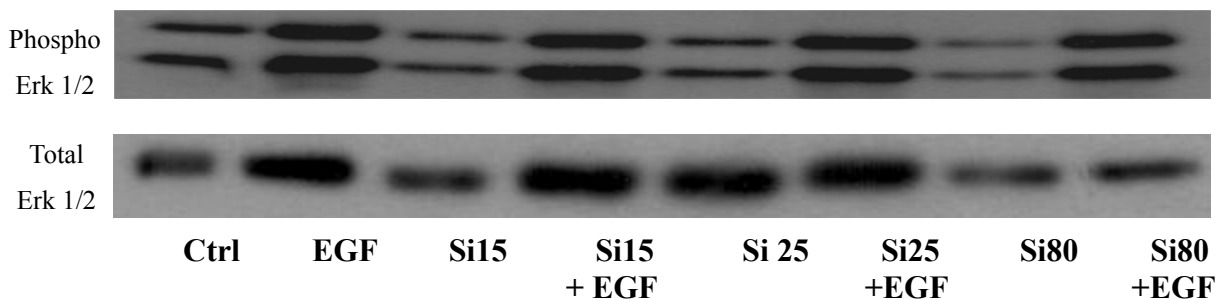
Die Daten dieses Versuches (Abb. 3.8.)<sup>1</sup> zeigen deutliche Trends hinsichtlich der Wirkung von EGF und Silikananopartikeln auf die Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt. Durch EGF erhöhten sich die Phosphorylierungslevels von Erk 1/2 relativ zum Gesamtprotein um ca. den Faktor 2,5. Die Anwesenheit der Silikananopartikel Si15, Si25 und Si80 reduzierten die Phosphorylierungslevel von Erk 1/2, wobei die Partikel Si15 den stärksten Effekt hatten (~70%). Die Si25 Partikel reduzierten die Erk-Aktivierung auf ~80% und die Si80 auf ~90% der Kontrolle. Wenn die Zellen nach der Partikelinkubation mit EGF-haltigem Medium inkubiert wurden, wird der EGF-Effekt durch die Partikel Si15 um etwa ein Fünftel reduziert. Die Si25 Partikel reduzierten den EGF-Effekt nur leicht, und die Si80 verstärkten den Effekt leicht. Unter den Abbildungen 3.8.2 sind repräsentative Autoradiographien der Western Blots mit phosphoryliertem Erk bzw. dem Erk 1/2 Gesamtprotein als Ladekontrolle ausgeführt.

Die Untersuchungen zur Phosphorylierung von Akt im selben Versuch (Abb. 3.8.3) ergab ein ähnliches Ergebnis wie für Erk 1/2. EGF induzierte eine Erhöhung der Phosphorylierung des Proteins um ca. Faktor 3. Interessanterweise zeigte die Zugabe von Silikapartikeln zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt. Die Wirkung von EGF in mit Silikananopartikel-behandelten Zellen zeigte jedoch einen vergleichbaren Trend für die Akt-Phosphorylierung. Die Exposition mit Si15-Partikeln reduzierte den EGF-Effekt um ca. ein Sechstel. Die Applikation von Si25 und Si80 Partikeln scheinen den EGF-Effekt eher zu verstärken. Unter den Abbildungen 3.8.4 sind repräsentative Autoradiographien der Western Blots mit phosphoryliertem Akt bzw. des Akt-Gesamtproteins als Ladekontrolle abgebildet.

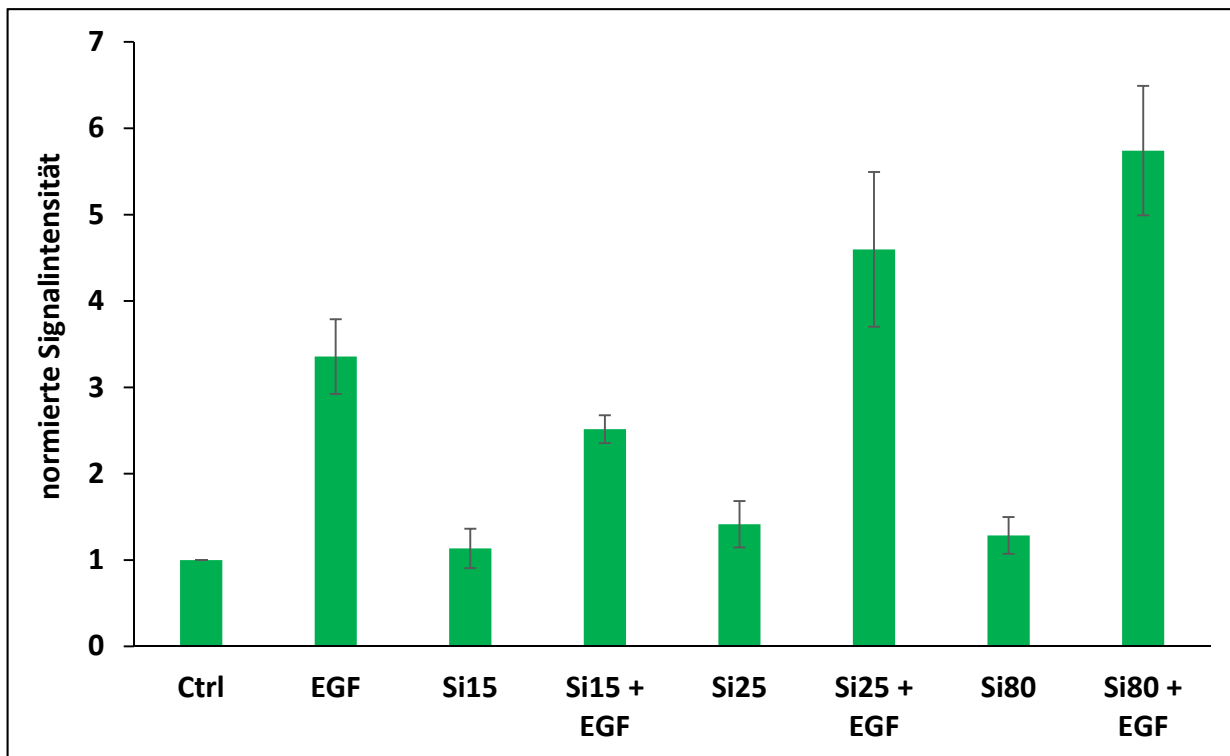
Die Aktivierung von Akt gilt als spezifischer Signaltransduktionsschritt, der von schwer löslichen Partikeln in Epithelzellen ausgelöst wird. Während die Erk1/2-Signalkaskade über verschiedene Wege aktiviert wird, ist die Phosphorylierung von Akt ein Signalschritt, der spezifisch auf membranabhängige Ereignisse, wie die Anreicherung von Ceramiden im Lipidraft und die Aktivierung der membranständigen PI3K, zurückzuführen ist (Unfried 2008, Peuschel 2012). Aus diesem Grund wurden die Effekte von hydrophoben Kohlenstoffnanopartikeln (CNP) mit den effektivsten Silikananopartikeln Si15 in einem weiteren Versuch verglichen (Abb. 3.8.5). Wie in dem vorherigen Versuch wurde die Phosphorylierung von Akt nach 5-minütiger Partikelbelastung und anschließender Inkubation mit Serum-reduziertem Medium bzw. mit EGF angereichertem Medium gemessen. Während beide Partikelarten keinen signifikanten Einfluss auf die Hintergrundaktivität von Akt unter diesen Bedingungen nehmen, konnte in diesem Experiment ein deutlicher Effekt von Si15 Partikel auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Akt beobachtet werden. Durch die Behandlung mit diesen Partikeln kommt es zu einer signifikanten Reduktion der EGF-abhängigen Aktivierung um ca. 40 % ( $p=0.017$ ). Die Kohlenstoffpartikel (CNP) nehmen keinen signifikanten Einfluss auf die EGF-induzierte Aktivierung von Akt. Repräsentative Autoradiographien der Signale von dem gesamten Akt-Protein (interne Kontrolle) und seiner phosphorylierten Form sind unter 3.8.6 aufgeführt.



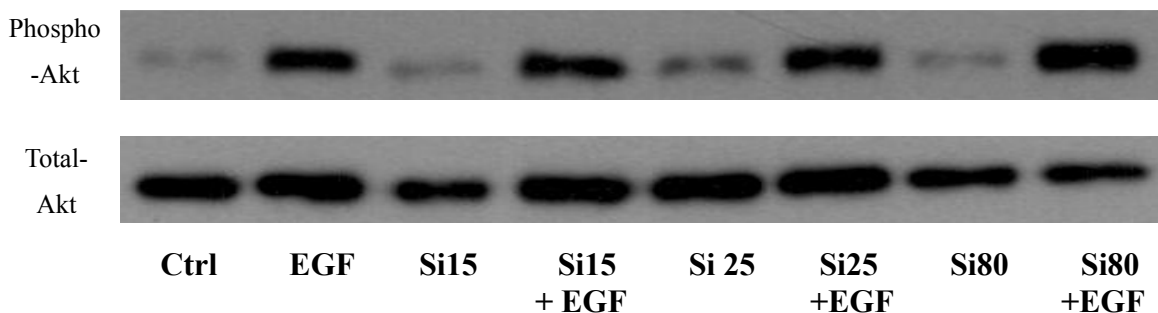
**Abbildung 3.8.1: Normierte Phosphorylierungslevel von Erk 1/2.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln bzw. EGF [100 ng/ml] belastet und die phosphorylierte Form von Erk 1/2 mittels Western Blot nachgewiesen. Mittelwerte und Standardfehler der normierten Signale von  $n=3$  unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **Ctrl:**  $\text{H}_2\text{O}$ .



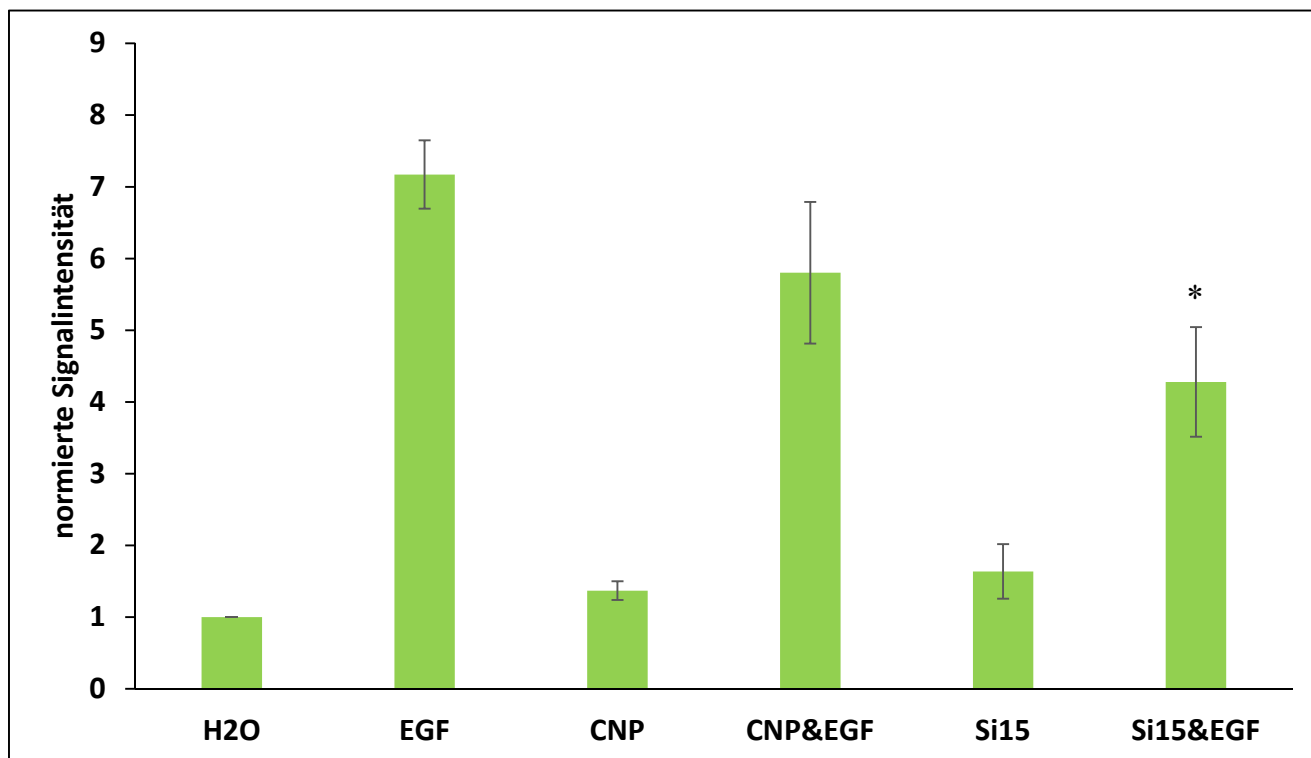
**Abbildung 3.8.2: Repräsentative Abbildungen der Autoradiographien der Western Blots (Erk 1/2).** RLE-Zellen wurden für 5 min mit Nanopartikeln belastet und die phosphorylierte Form von Erk 1/2 mittels Western Blots nachgewiesen. Oben: Erk 1/2; unten: total Erk.



**Abbildung 3.8.3: Normierte Phosphorylierungslevel von Akt I.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit 33 µg/ml Nanopartikeln bzw. EGF [100 ng/ml] belastet. Danach wurden die Zellen für 30 min mit Serum-reduziertem Medium bzw. EGF-haltigem Medium inkubiert. Mittelwerte und Standardfehler der normierten Phosphorylierungssignale von n=3 unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **Ctrl:** H<sub>2</sub>O.

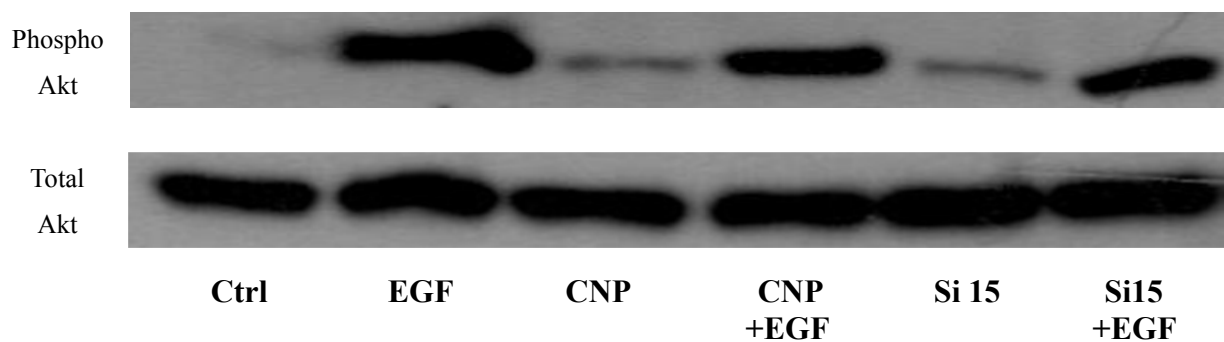


**Abbildung 3.8.4: Repräsentative Abbildungen der Autoradiographien der Western Blots (Akt).** RLE-Zellen wurden für 5 min mit Nanopartikeln belastet und die phosphorylierten Formen der Proteinkinase B mittels Western Blots nachgewiesen. Oben: Akt; unten: total Akt.



**Abbildung 3.8.5: Normierte Phosphorylierungslevel von Akt II.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit 33 µg/ml Nanopartikeln belastet. Danach wurden die Zellen für 30 min mit Serum-reduziertem Medium bzw. EGF-haltigem [100 ng/ml] Medium inkubiert. Mittelwerte und Standardfehler der normierten Phosphorylierungssignale von n=3 unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. Si15: kolloidaler Silikapartikel; CNP: Carbon Black; Ctrl: H<sub>2</sub>O.

Signifikanzniveau (Bonferroni-Test)  $p < 0,05$  im Vergleich zur EGF-Kontrolle



**Abbildung 3.8.6: Repräsentative Abbildungen der Autoradiographien der Western Blots (Akt) II.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit Nanopartikeln belastet und die phosphorylierten Formen der Proteinkinase B mittels Western Blots nachgewiesen. Oben: Akt; unten: total Akt.

### 3.5.2 Phosphorylierung von Erk 1/2 und Akt nach 5 min und 3,5 h

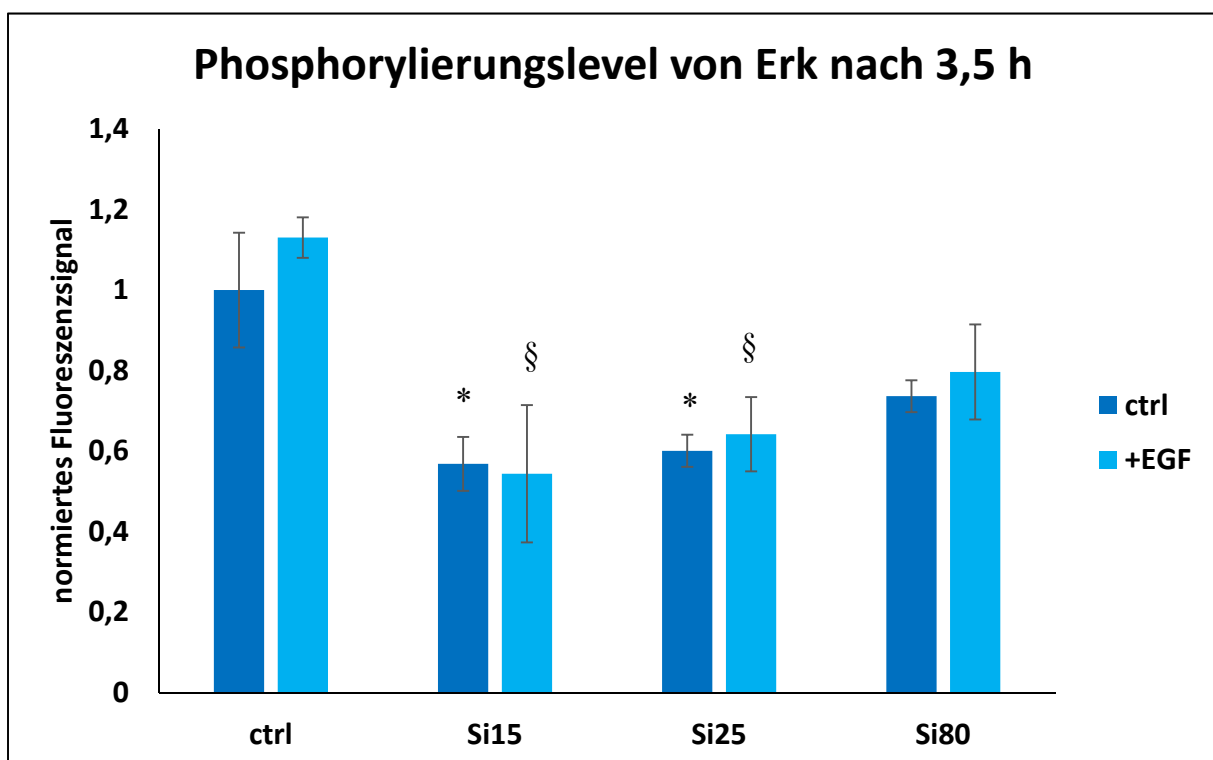
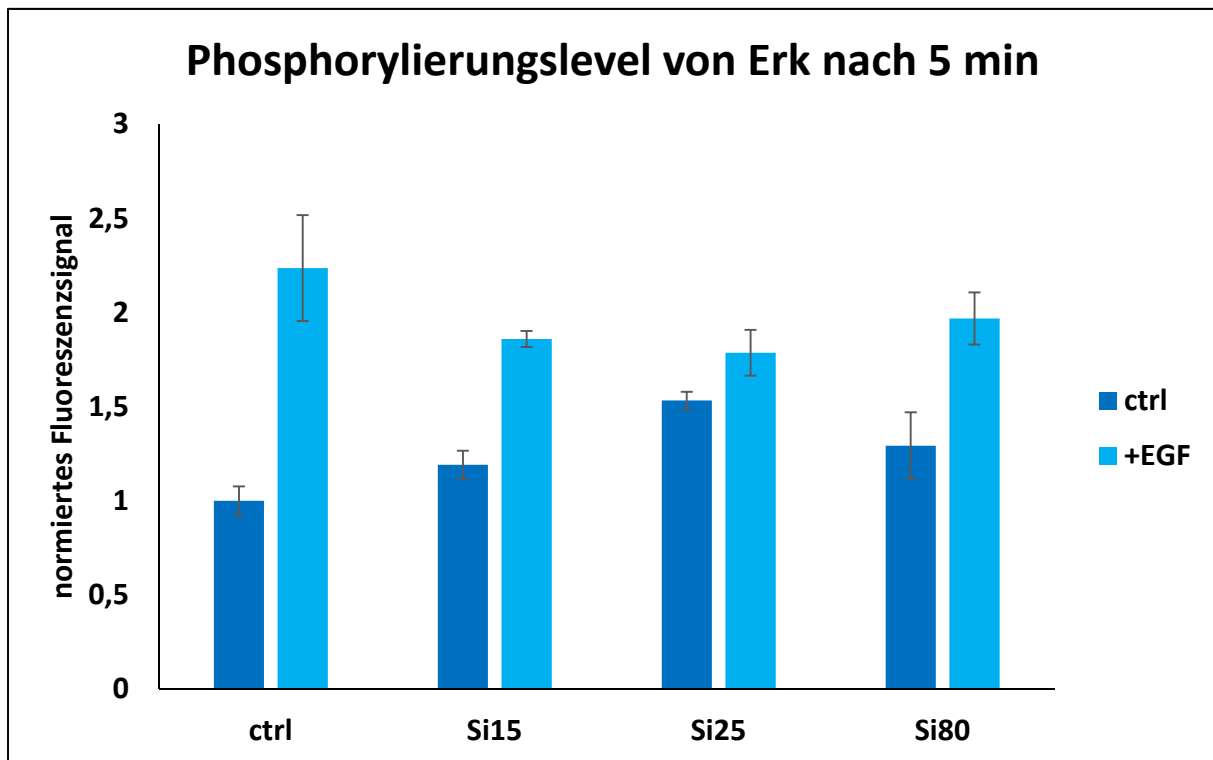
Im vorangegangenen Versuch konnte durch Western Blots deutliche Trends für die inhibierende Wirkung von Silikananopartikeln auf die EGF-abhängige Aktivierung der Kinasen Erk 1/2 und Akt gezeigt werden. Für Si15, die die effektivste Reduktion der Proliferation bewirkten, konnte ein signifikanter Einfluss auf die Aktivierung des membranständigen Signalproteins Akt nachgewiesen werden. Die Relevanz dieser Befunde sollte mit einer zweiten gänzlich unabhängigen Methode nachvollzogen werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob der Partikeleffekt nach 3,5 h reversibel ist und die Kinasen durch EGF-Zugabe wieder aktiviert werden können. In früheren Studien hatte sich gezeigt, dass die durch Kohlenstoffpartikel induzierte Aktivierung der Kinasen Erk 1/2 und Akt nach 4 Stunden nicht mehr detektierbar ist (Peuschel *et al.*, 2010). Um eine mögliche Verstärkung des inhibierenden Effekts der Partikel zu erzielen, wurde eine primäre Inkubationszeit mit den Partikeln von 30 Minuten gewählt. Die Effekte wurden nach 5 Minuten und 3,5 Stunden untersucht. Als unabhängiges Versuchssystem wurde ein Mitteldurchsatzverfahren basierend auf Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Eine quantitative Auswertung sowie die mikroskopische Analyse der aktivierten Proteine erfolgte mittels des ArrayScan™ High-Content Systems ‚Cellomics‘. Anhand der Zellkern-Färbung wurden durch die Software die Zellen identifiziert und die Stärke des Signals von phosphoryliertem Erk 1/2 bzw. Akt detektiert (Abb. 3.9.1 - 3.9.4).

Die Applikation von Silikananopartikeln hat keinen deutlichen Einfluss auf den Hintergrundlevel von phosphoryliertem Erk 1/2. Nach 5 min Inkubation mit EGF-haltigem Medium war die MAPK Erk 1/2 um das 2,3-fache im Vergleich zur Negativkontrolle verstärkt (Abb. 3.9.1). Auch in diesem Versuch zeigte sich ein Trend zur Reduktion des EGF-Effekts durch die Nanopartikel, denn durch die vorherige Gabe von allen drei kolloidalen Silikapartikeln war die Phosphorylierung von Erk 1/2 reduziert. Die Effekte zeigten jedoch keine statistische Signifikanz. Zum späteren Zeitpunkt (3,5 h nach EGF-Gabe) war offensichtlich der aktivierende EGF-Effekt abgeklungen. Da die Phosphorylierung von Erk1/2 in allen Ansätzen mit Nanopartikeln niedriger als in den nicht exponierten Ansätzen war, konnte hier kein spezifischer Effekt auf die EGF-abhängige Signaltransduktion beobachtet werden. Analog zu den Proliferationsexperimenten konnte auch ein Effekt auf die Basisaktivität der proliferativen Erk 1/2-Signaltransduktion beobachtet werden. Die Si15 und Si25 Partikel haben die Phosphorylierung von Erk 1/2 in Anwesenheit und in Abwesenheit von EGF im Vergleich zu den Kontrollen (H<sub>2</sub>O bzw. EGF) signifikant reduziert. Diese

Reduktion war nach Inkubation mit Si15 Partikeln am stärksten ausgeprägt (~50%) und bei den Si25 Partikeln am zweitstärksten (~40%). Die Si80 Partikel zeigen auch diesen Trend (~30%), jedoch wurde dieser nicht signifikant getestet. Es konnte ein größenabhängiger Effekt der Partikel beobachtet werden.

Wie auch schon in den Western Blot Experimenten konnten auch in diesem unabhängigen Assay bezüglich der Aktivierung von Akt deutlichere Effekte der Silikananopartikel beobachtet werden. Im Kurzzeitversuch (Abb. 3.9.3) konnte zwar nur eine mäßige Aktivierungsrate von Akt durch EGF beobachtet werden. Die Vorbehandlung mit Silikananopartikeln (Si15 und Si80) führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion dieses Signals. Wie auch in der Analyse von Erk1/2, konnte nach 3,5 h Inkubation eine Reduktion der Hintergrundaktivierung beobachtet werden. Da die Signaltransduktion über Akt auch 3,5 Stunden nach Applikation von EGF verstärkt war, zeigte die Behandlung mit den Nanopartikeln in allen drei Fällen einen deutlichen, signifikanten Effekt. Ohne EGF-Zugabe konnte nur bei den Si15 Partikeln ein signifikanter Effekt im Vergleich zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle beobachtet werden, während die Si25 und Si80 Partikel die Aktivierung von Akt nur leicht reduzierten.

Die Western Blots zeigen einen größenabhängigen Einfluss der Silikananopartikel auf die Signalkinasen Erk 1/2 und Akt, der nicht signifikant getestet wurde. Dieser größenabhängige Effekt der Partikel konnte in dem mikroskopischen Assay nur bei Erk 1/2 nach 3,5 h zu beobachtet werden. In allen Experimenten konnten die Phosphorylierungslevels durch eine zusätzliche Gabe von EGF nicht oder nicht vollständig auf das Kontrollniveau aktiviert werden. Das lässt einen EGF-abhängigen Mechanismus der Partikel vermuten.

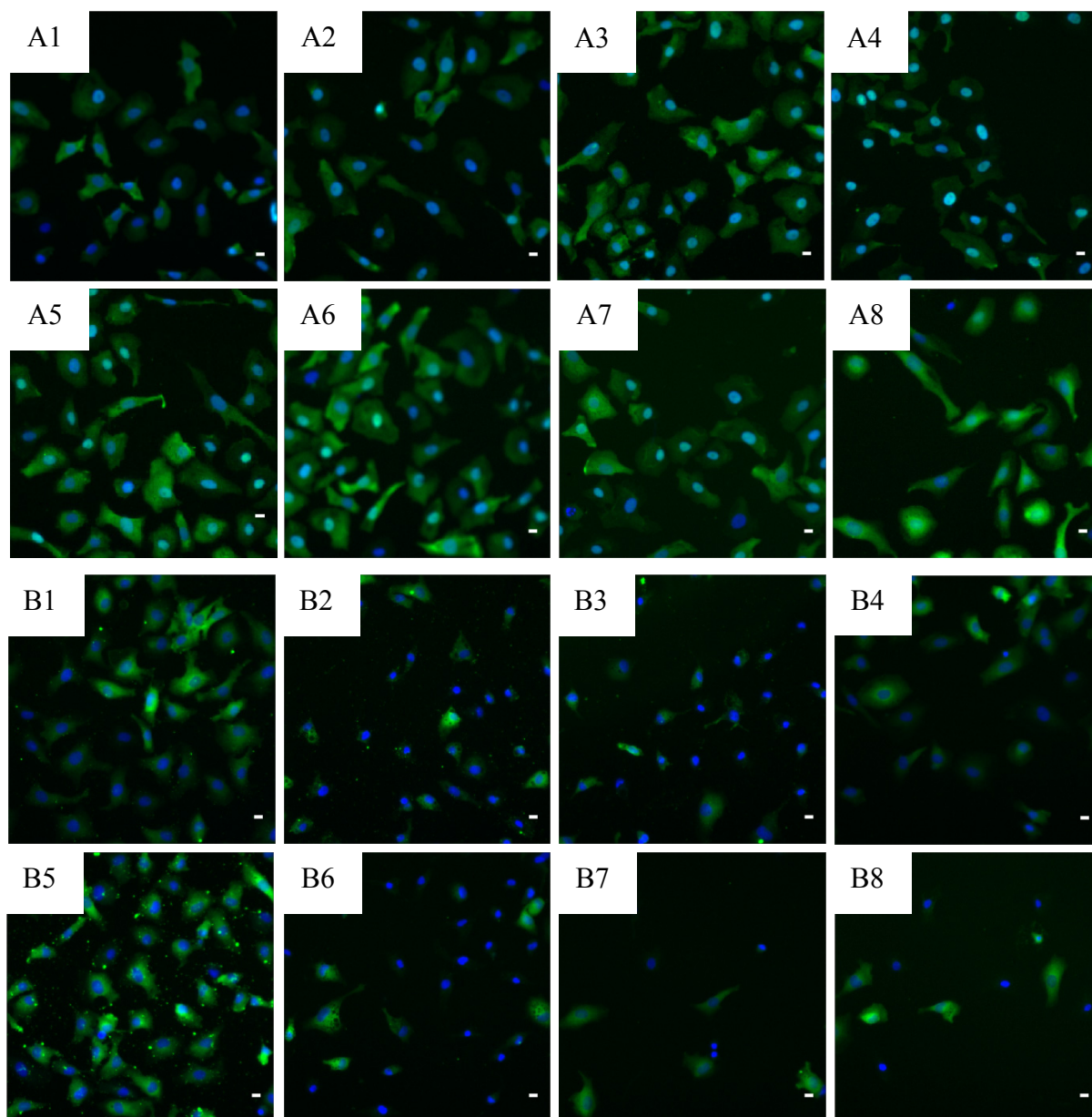


**Abbildung 3.9.1: Normierte Phosphorylierungslevel von Erk 1/2.** RLE-Zellen wurden für 30 min mit 33 µg/ml Nanopartikeln belastet. Danach wurden die Zellen für 5 min bzw. 3,5 h mit Serum-reduziertem Medium bzw. EGF-haltigem [100 ng/ml] Medium inkubiert. Mittelwerte und Standardfehler der normierten Phosphorylierungssignale von n=3 unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. **Si15, Si25, Si80:** kolloidale Silikapartikel; **Ctrl:** H<sub>2</sub>O.

\* Signifikanzniveau zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle (Bonferroni-Test)  $p < 0,05$

§ Signifikanzniveau zur EGF-Kontrolle (Dunnnett-Test)  $p < 0,05$

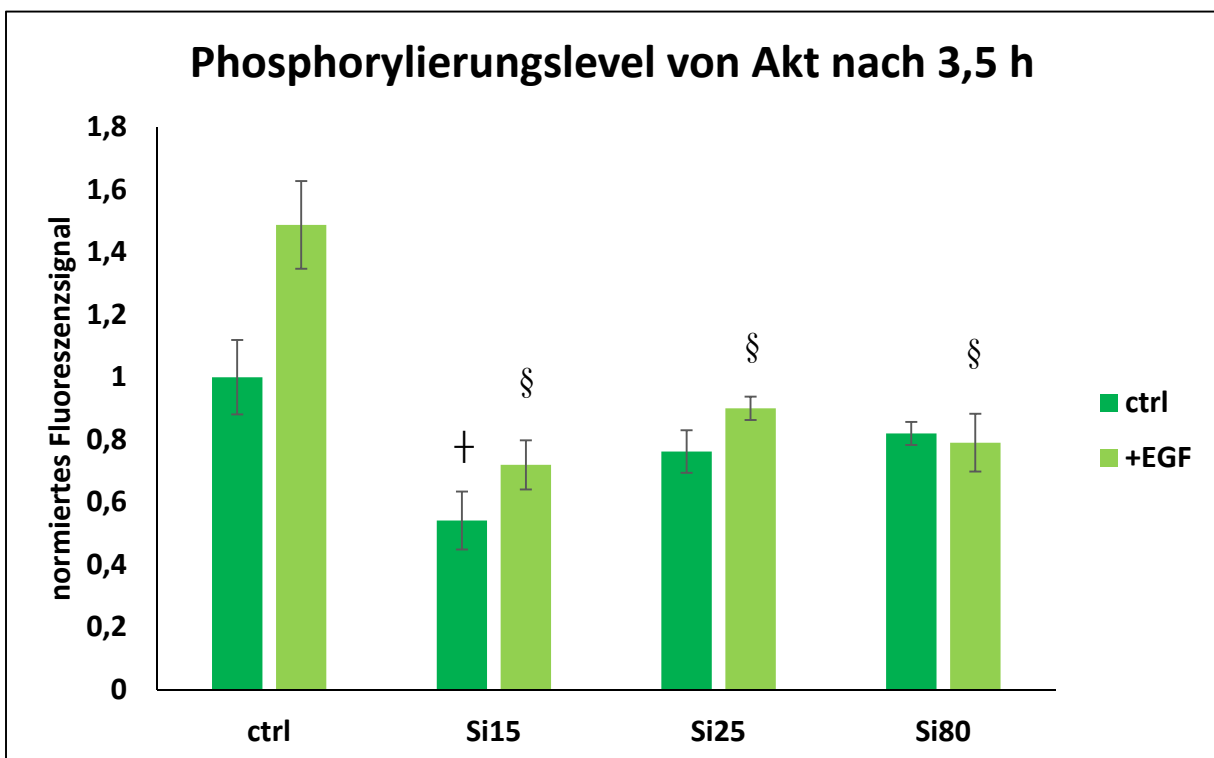
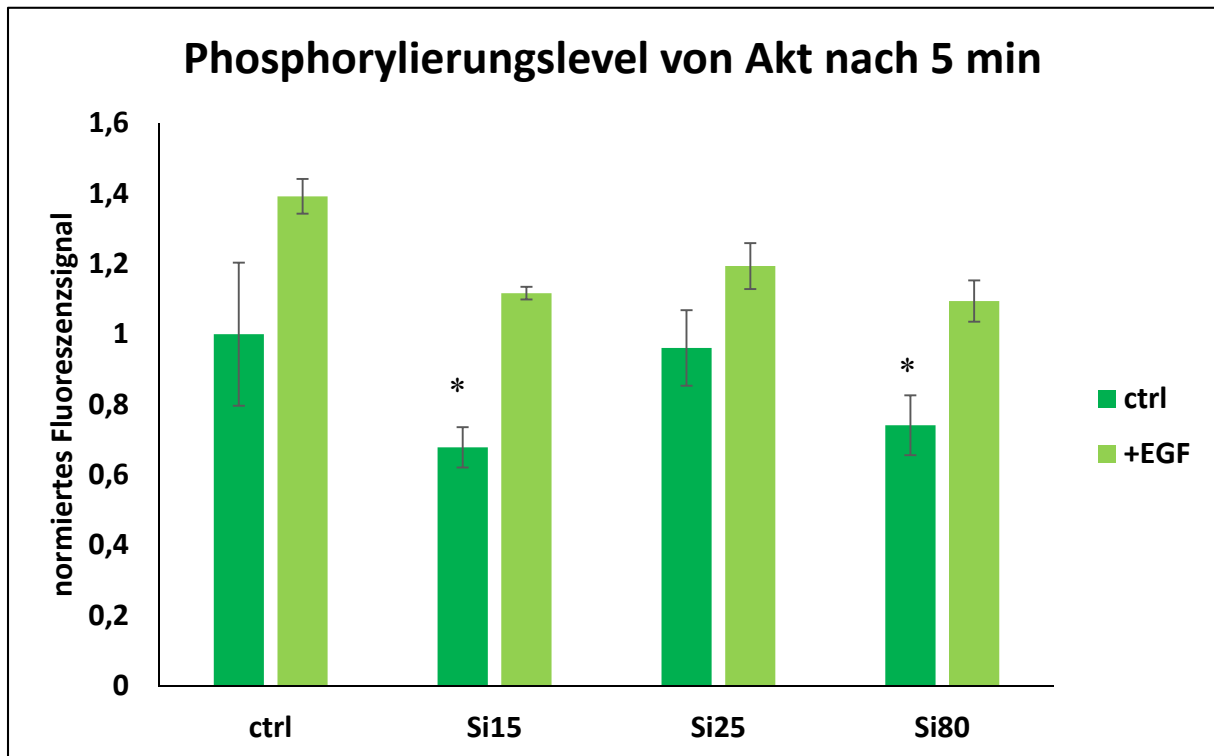




**Abbildung 3.9.2: Repräsentative Bilder von Erk 1/2 bestimmt mit dem Cellomics ArrayScan.** RLE-Zellen wurden für 30 min mit 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Nanopartikeln belastet. Danach wurden die Zellen für 5 min bzw. 3,5 h mit Serum-reduziertem Medium bzw. EGF-haltigem Medium inkubiert Kontrolle:  $\text{H}_2\text{O}$ . Blau: DAPI-Zellkernfärbung; Grün: phospho-Erk 1/2. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

**A:** 5 min; **A1+A5:** Kontrolle  $\text{H}_2\text{O}$ ; **A2+A6:** Si15; **A3+A7:** Si25; **A4+A8:** Si80; **A5-8:** +EGF

**B:** 4 h; **B1+B5:** Kontrolle  $\text{H}_2\text{O}$ ; **B2+B6:** Si15; **B3+B7:** Si25; **B4+B8:** Si80; **B5-8:** +EGF

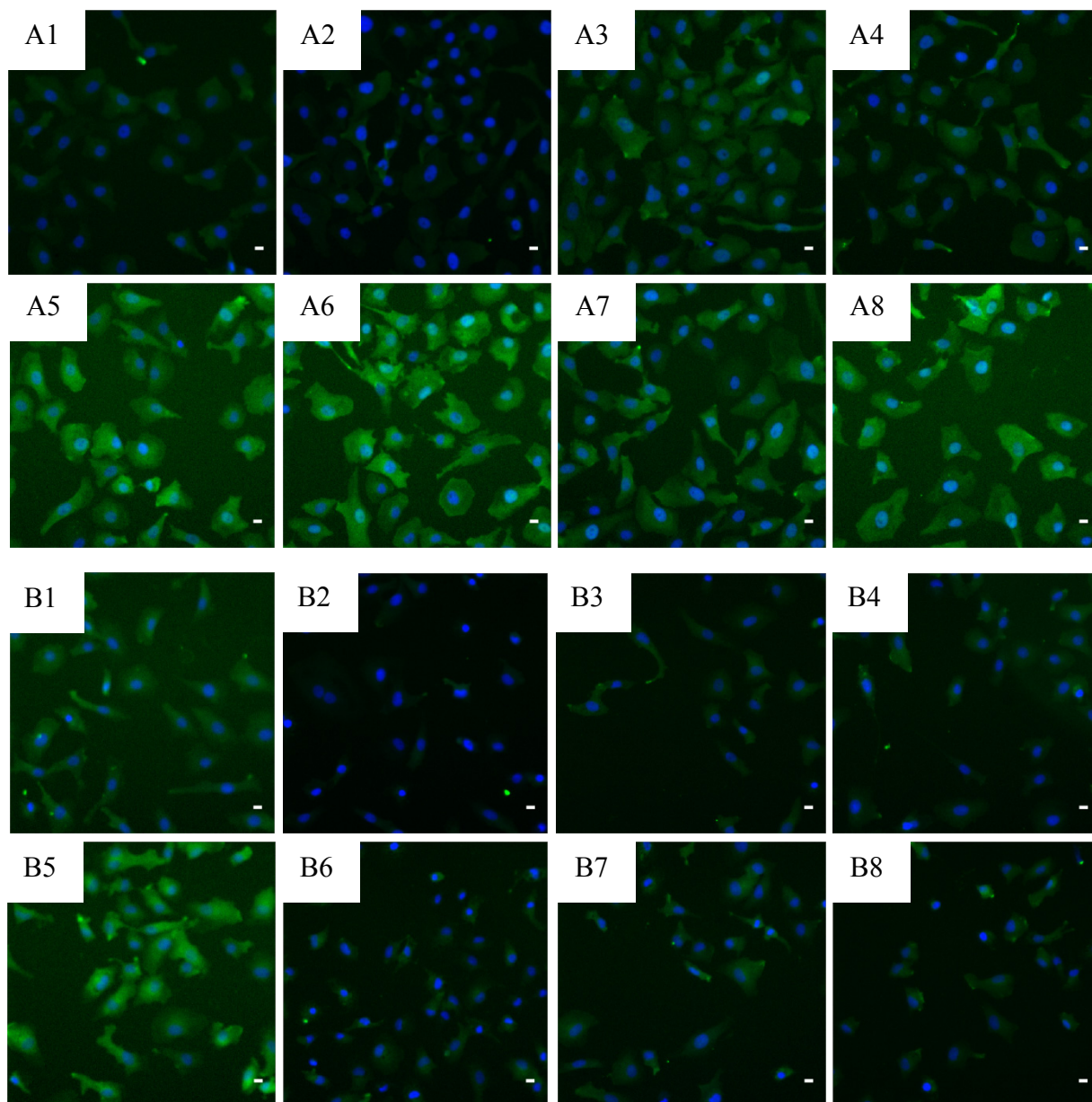


**Abbildung 3.9.3: Normierte Phosphorylierungslevel von Akt 1.** RLE-Zellen wurden für 30 min mit 33 µg/ml Nanopartikeln belastet. Danach wurden die Zellen für 5 min bzw. 3,5 h mit Serum-reduziertem Medium bzw. EGF-haltigem [100 ng/ml] Medium inkubiert. Mittelwerte und Standardfehler der normierten Phosphorylierungssignale von n=3 unabhängigen Versuchen wurden im Diagramm aufgeführt. Si15, Si25, Si80: kolloidale Silikapartikel; Ctrl: H<sub>2</sub>O.

\* Signifikanzniveau zur EGF-Kontrolle (Bonferroni):  $p < 0,05$

† Signifikanzniveau zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle (Bonferroni):  $p < 0,05$

§ Signifikanzniveau zur EGF-Kontrolle (Bonferroni):  $p < 0,05$



**Abbildung 3.9.4: Repräsentative Bilder von Akt 1 bestimmt mit dem Cellomics ArrayScan.** RLE-Zellen wurden für 30 min mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln belastet. Danach wurden die Zellen für 5 min bzw. 3,5 h mit Serum-reduziertem Medium bzw. EGF-haltigem Medium inkubiert Kontrolle:  $\text{H}_2\text{O}$ . Blau: DAPI-Zellkernfärbung; Grün: phospho-Akt. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

**A:** 5 min; **A1+A5:** Kontrolle  $\text{H}_2\text{O}$ ; **A2+A6:** Si15; **A3+A7:** Si25; **A4+A8:** Si80; **A5-8:** +EGF

**B:** 4 h; **B1+B5:** Kontrolle  $\text{H}_2\text{O}$ ; **B2+B6:** Si15; **B3+B7:** Si25; **B4+B8:** Si80; **B5-8:** +EGF

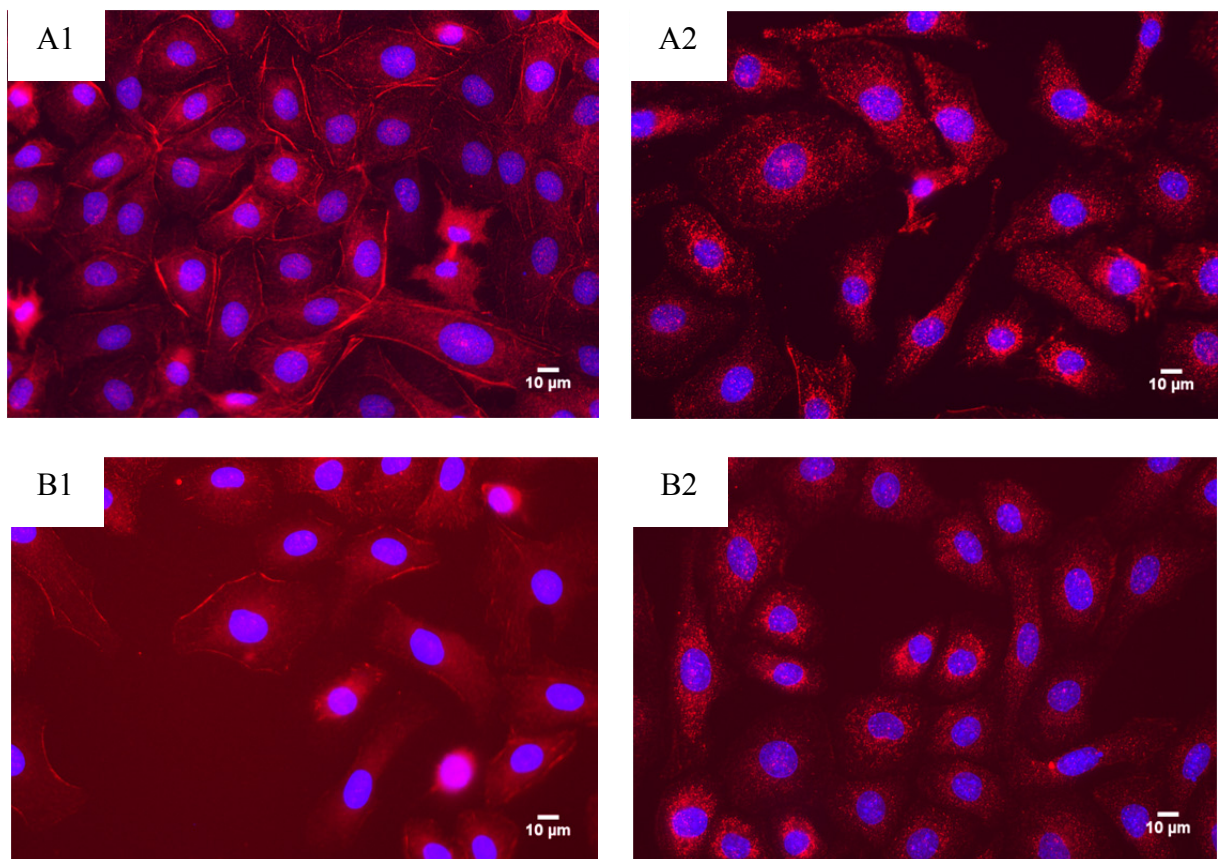
### 3.6 Translokation des EGFRs

Die Internalisierung des EGFRs ist ein Zeichen für die Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalwegs (Yarden, 2011). Durch die Experimente zur Phosphorylierung des EGFRs konnte eine Reduzierung des Aktivierungslevels des Rezeptors durch die Si15 und Si25 Partikel detektiert werden. Aufbauend auf diesen Befund sollte nun einerseits untersucht werden, ob die Effekte von Silikananopartikeln sich auch auf der Ebene der Internalisierung des EGFRs nachvollziehen lassen. Für diesen Versuch wurden RLE-Zellen mit den kolloidalen Silikapartikeln (Si15, Si25 und Si80) und mit EGF als Positivkontrolle für 5 min belastet. Andererseits sollten aber auch erste mechanistische Untersuchungen zur Natur der Interaktion von Silikananopartikeln mit der Aktivierung des EGFR vorgenommen werden. Durch unterschiedliche Abfolgen in der Exposition der Zellen mit EGF und Silikananopartikeln sollte die Spezifität der Effekte der Silikananopartikel für EGFR-abhängige Signalereignisse gezeigt werden. In einem Szenario wurden die Partikel zugegeben und etwa 20 Sekunden danach EGF. Im zweiten Szenario wurden die Partikel etwa 20 Sekunden nach dem EGF zugegeben, sodass eine Bindung des EGFs an den Rezeptor ermöglicht wurde. Die subzelluläre Lokalisation des EGFR wurde nach 5 Minuten Belastungszeit mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

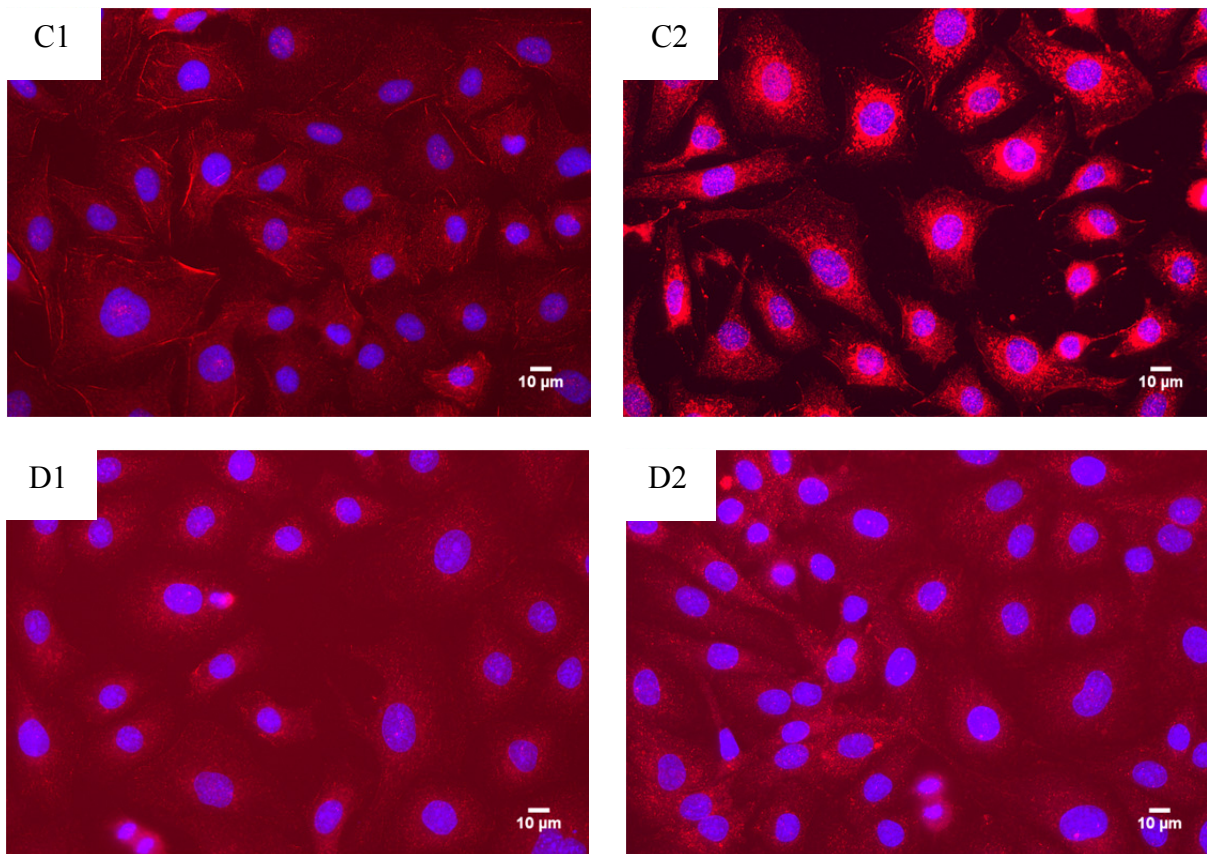
In RLE-Zellen, die als Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O unter Serum-reduzierten Bedingungen behandelt wurden (Abb. 3.10; A1), war ein großer Teil des EGFRs (rot) in der Membran am Rand der Zellen sowie eine leichte punktförmige Färbung im Innern der Zellen sichtbar. In den Abbildungen wurde der Zellkern (blau) der Zellen fokussiert. Nach Behandlung der Zellen mit EGF (A2) ist das punktförmige EGFR-Muster um den Zellkern stärker ausgeprägt, während sich der Anteil des EGFRs im Membranbereich stark verringert. Die Anwesenheit von Silikapartikeln nach der EGF-Zugabe hatte keinen Einfluss auf die EGF-induzierte EGFR-Translokation, denn nach Belastungen mit allen drei SiNP-Größen lag der EGFR, wie bei der Positivkontrolle, zum Nukleus transloziert vor (B2, C2, D2). Bei vorheriger Partikelzugabe wird die EGF-Wirkung von Si15 zu Si80 Partikeln immer geringer. Denn wurden die Silikananopartikel vor der EGF-Zugabe zu den Zellen gegeben, unterdrückten die Si15 und Si25 Partikel den Effekt des EGFs auf die Translokation des EGFRs (B1, C1). Der EGFR verblieb bei diesen Ansätzen im Rand der Zellen und nur ein kleiner Anteil des EGFRs wurde in die Zellen internalisiert, wobei dieser Anteil bei dem Ansatz mit Si15 Partikeln geringer als bei dem Ansatz mit Si25 Partikeln ausfiel. Die Si80 Partikel hatten zeigten keinen sichtbaren Effekt auf die Wirkungsweise des EGFs (D1 und D2), denn in beiden Ansätzen

wurde der EGFR durch das zugegebene EGF ähnlich wie bei der Positivkontrolle internalisiert und war als Punktmuster in der Umgebung des Nukleus zu erkennen.

Die Daten zeigen, dass sich die Wirkung der Silikananopartikel auf die Aktivierung des EGFR nicht nur auf der Ebene der Phosphorylierung des Rezeptors, sondern auch auf der Ebene der Internalisierung nachvollziehen lässt. Die unterschiedliche sequentielle Applikation von Silikananopartikeln und EGF zeigt, dass die beobachteten Signaltransduktionseffekte nicht durch unspezifische Interaktionen der Nanopartikel mit EGFR-abhängigen Signalereignissen oder gar mit den Assaysystemen induziert wurden. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass die kleineren der untersuchten Silikananopartikel auf der Ebene der Rezeptor-EGF-Interaktion wirken. Wenn eine Bindung des Liganden an den EGFR stattgefunden hat, so können die Partikel die Signaltransduktion nicht mehr aufhalten.



→



**Abbildung 3.10: Translokation des EGF-Rezeptors.** RLE-Zellen wurden für 5 Minuten mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln bzw. EGF [100 ng/ml] inkubiert und der EGF-Rezeptor gefärbt ( $n=3$ ). **A1:** Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ); **A2:** Kontrolle (EGF; 100 ng/ml) **B1:** erst Si15, dann EGF; **B2:** erst EGF, dann Si15 **C1:** erst Si25, dann EGF; **C2:** erst EGF, dann Si25 **D1:** erst Si80, dann EGF; **D2:** erst EGF, dann Si80. Blau: Nukleus (DAPI); rot: EGFR.; Fluoreszenzmikroskop: BX 60 (Olympus), 40 x Öl-Objektiv.

### 3.7 Markierung von EGF mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto488

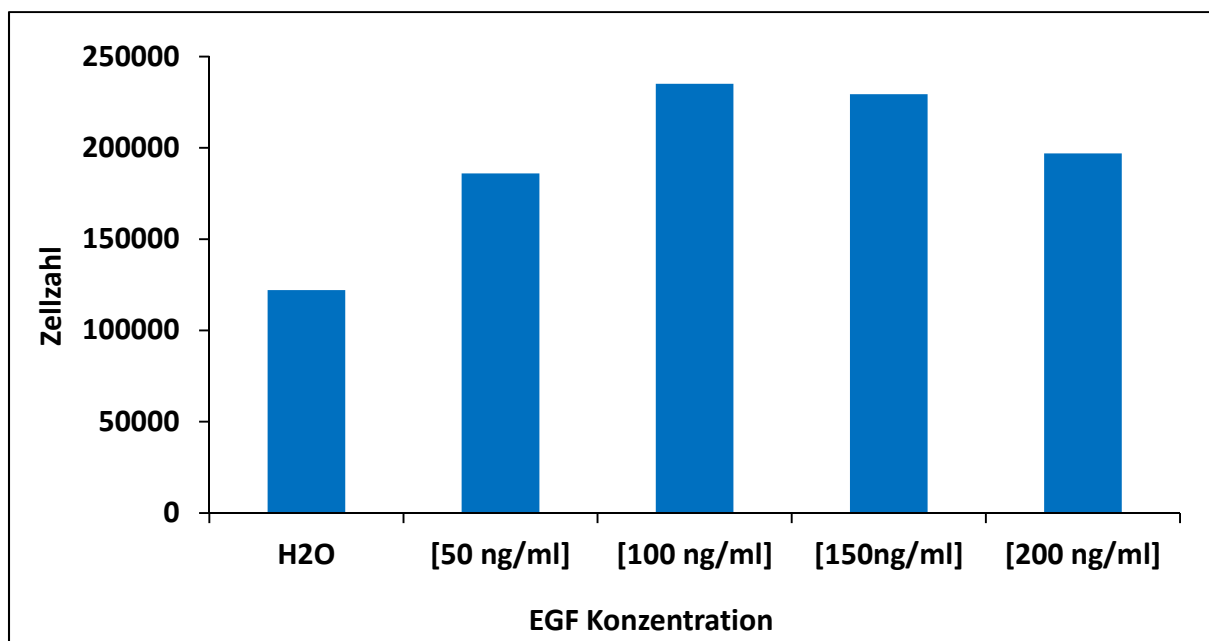
Mit den Versuchen zur Aktivierung der EGFR-abhängigen Signaltransduktion wurde gezeigt, dass die Silikananopartikel die Aktivierungslevels des EGFRs und der Kinasen Erk 1/2 und Akt reduzieren und eine Stimulation durch EGF keine Wirkung auf diese Reduktion hat. Durch die weiteren Experimente sollte der Mechanismus hinter den Effekten der Silikananopartikel untersucht werden und die Hypothese, dass EGF an der Oberfläche von den SiNP bindet, überprüft werden. Um die Interaktion zwischen EGF und Silikananopartikeln mittels fluoreszierender Gele und konfokaler Laserrastermikroskopie zu untersuchen, wurde humaner rekombinanter EGF (R&D Systems) mithilfe des reaktiven Derivats Atto488-NHS (Sigma-Aldrich) fluoreszenzmarkiert. Als Ausgangsstoffe wurden der Succinimidyl-Ester des Farbstoffs und EGF eingesetzt, welche über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft wurden. Bei der Reaktion der aktiven Carbonsäure mit einer primären Aminogruppe des EGFs entsteht eine Amidbindung. Sequenzanalysen haben ergeben, dass der humane EGF zweimal die Aminosäure Lysin sowie die Aminogruppe am N-Terminus enthält. Daher wurde erwartet, dass maximal drei Fluorophore an EGF gekoppelt werden. Das Verhältnis zwischen Farbstoff (in der Formel als D bezeichnet) und dem Protein EGF (in der Formel als P bezeichnet) wurde über Absorptionsmessungen mit der Formel 3 bestimmt. Dabei sind:  $\epsilon_{\text{EGF}} = 18.500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  ist der molare Extinktionskoeffizient von EGF bei einer Wellenlänge von 280 nm und  $\epsilon = 90.000$  ist der molare Extinktionskoeffizient von Atto488 bei 498 nm (Lukasik *et al.*, 2006; Protokoll Sigma-Aldrich). A280 und A498 sind die gemessenen Absorptionen bei der Wellenlänge 280 nm bzw. 498 nm. Durch den Korrekturfaktor 0,10 in der Formel, der durch das Protokoll des Herstellers vorgegeben wurde, wird der Wert aufgrund der Absorption der Fluorophore bei 280 nm bereinigt. Die Berechnung ergab ein Verhältnis von etwa einem Atto488-Molekül pro EGF-Molekül (Fluorophor/Protein-Verhältnis = 0,98), was bedeutet, dass an jedem EGF ein Fluorophor gekoppelt wurde.

**Formel 3:** Berechnung der Markierungseffizienz

$$D/P = \frac{A498 \times \epsilon 18.500}{[A280 - (A498 \times 0,10)] \times \epsilon 90,000}$$

Die Wirksamkeit des markierten EGF (im Folgenden als EGF-L bezeichnet) wurde mit einem Versuch zum Wachstumsverhalten der RLE-Zellen in Anwesenheit von EGF-L überprüft.

Dafür wurden Zellen mit EGF-L für 24 h behandelt und die Zellzahl mit dem Zellzähler ‚Casy‘ (OLS OMNI Life Science) bestimmt. In der Abbildung 3.11 wurden die Zellzahlen gegen die EGF-L Konzentrationen aufgetragen. Der größte Effekt des markierten EGF auf die Proliferation wurde mit einer Konzentration 100 ng/ml erzielt. Mit 50 ng/ml wurde auch nur etwa die Hälfte des Wachstumseffekts erlangt und oberhalb von 100 ng/ml stagnierte die Zellzahl oder sank oberhalb von 150 ng/ml wieder. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Erfahrungswerten mit nicht markiertem EGF aus den vorangegangenen Versuchen. Das markierte EGF wies bei diesem Experiment eine vergleichbare Proliferationsrate wie das unmarkierte EGF in den Proliferationsversuchen auf.



**Abbildung 3.11: Überprüfung der EGF-induzierten Proliferation nach der Markierung mit Atto448.** RLE-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen EGF-L inkubiert. Die Zellen wurden mithilfe des CasyTon Zellzählers ausgezählt. Kontrolle H<sub>2</sub>O. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt.

### 3.7.1 Charakterisierung der SiNP in Anwesenheit von EGF

Die Charakterisierung der Silikananopartikel in Anwesenheit von EGF wurde durchgeführt, um Veränderungen des elektrischen Potentials und/oder des Agglomerationsverhaltens der SiNP zu untersuchen. Dabei wurden die Partikel mit humanem EGF bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und mit EGF-freien Partikelsuspensionen verglichen. Repräsentativ wurde je eine Partikel-Charge der SiNP (Anhang; Tab. 6.1.1) gewählt und das  $\zeta$ -Potential, zunächst ohne EGF, in drei Konzentrationen (jeweilige Stammlösung, 66  $\mu\text{g/ml}$  und 33  $\mu\text{g/ml}$ )



bestimmt. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des EGFs und weil die Methode nicht für geringere Partikelkonzentrationen geeignet ist, wurde nur die Konzentration 0,066 mg/ml mit EGF gemessen. Die Konzentration von 33 µg/ml bzw. das Verhältnis zwischen Partikeln und EGF entsprach der verwendeten Konzentration aus den Zell-Experimenten. Für die DLS-Messungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wurden die drei kolloidalen Silikapartikel zunächst in den jeweiligen Stammlösungen ohne EGF-Zugabe gemessen. Der hydrodynamische Durchmesser dieser Daten wurde über die Kumulativmethode bestimmt und durch die Volumenverteilung dargestellt. In Anwesenheit von EGF wurde der hydrodynamische Durchmesser nur von den Si80 Partikeln in der Konzentration 66 µg/ml bestimmt, weil die Größe der Si15 und Si25 Partikel, sowie die Konzentration 33 µg/ml, für diese Methode zu gering ist. Die Daten in Anwesenheit von EGF wurden über die Intensitätsverteilung ausgewertet, bei der Partikel bzw. Agglomerate mit größerer Streuung stärker berücksichtigt werden (Berne und Pecora, 2000).

**Tabelle 3.1:  $\zeta$ -Potentiale und hydrodynamischer Durchmesser der SiNP ohne Zugabe von EGF.** Die SiNP wurden unverdünnt und mit Milli-Q-Wasser auf 66 µg/ml und 33 µg/ml verdünnt verwendet und das  $\zeta$ -Potential unter Zugabe von KCl [0,01 M], sowie der hydrodynamische Durchmesser, bestimmt.

\* über die Volumenverteilung bestimmt

\*\* über die Intensitätsverteilung bestimmt

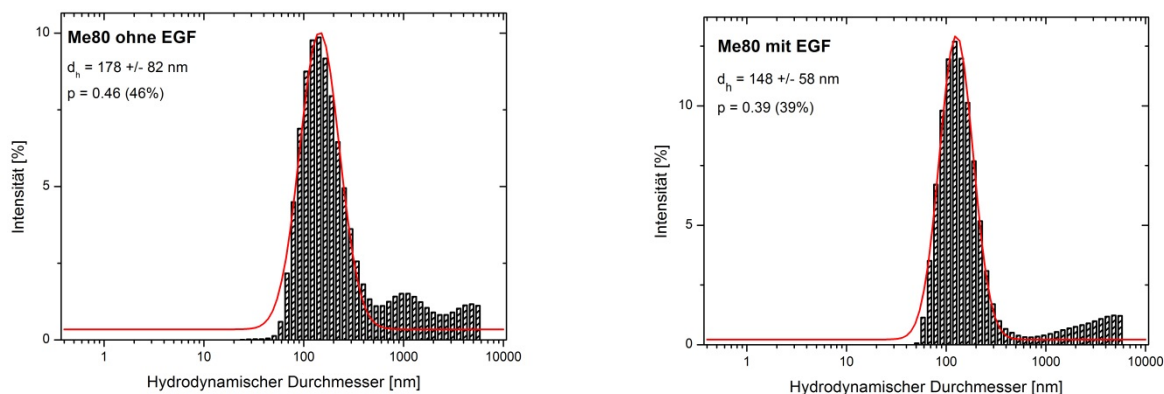
<b><math>\zeta</math>-Potential und hydrodynamischer Durchmesser der kolloidalen SiNP ohne EGF</b>			
<b>SiNP-Charge</b>	<b>SiO<sub>2</sub> -Gehalt [mg/ml]</b>	<b><math>\zeta</math>-Potential [mV]</b>	<b>hydrodynamischer Durchmesser [nm]</b>
Me15-K_scw	4	-30 ± 2	11 ± 3 *
	0,066	-49 ± 7	-
	0,033	-36 ± 12	-
Me25-L_scw	5,5	-29 ± 2	19 ± 8 *
	0,066	-36 ± 7	-
	0,033	-31 ± 8	-
Me80-L_scw	3	-27 ± 0	87 ± 22 *
	0,066	-31 ± 1	176 ± 82 **
	0,033	-33 ± 5	-

**Tabelle 3.2:  $\zeta$ -Potentiale und Größenverteilungen der SiNP mit Zugabe von EGF.** Die SiNP wurden mit Milli-Q-Wasser auf 66  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und das  $\zeta$ -Potential unter Zugabe von KCl [0,01 M] sowie der hydrodynamische Durchmesser in Anwesenheit von EGF [100 ng/ml] bestimmt.

\*\* über die Intensitätsverteilung bestimmt

<b><math>\zeta</math>-Potential und hydrodynamischer Durchmesser der kolloidalen SiNP mit EGF</b>			
<b>SiNP-Charge</b>	<b>SiO<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ml]</b>	<b><math>\zeta</math>-Potential [mV]</b>	<b>hydrodynamischer Durchmesser [nm]</b>
Me15-K_scw	0,066	-20 $\pm$ 0	-
Me25-L_scw	0,066	-27 $\pm$ 3	-
Me80-L_scw	0,066	-33 $\pm$ 4	148 $\pm$ 58 **

Die gemessenen  $\zeta$ -Potentiale der Silikapartikel ohne EGF lagen im negativen Bereich zwischen -27 und -50 mV (Tab. 3.1), was ein Anzeichen für eine hohe Stabilität der Partikel ist. Dennoch lagen die  $\zeta$ -Potentiale aller Verdünnungen und aller SiNP in einem ähnlichen negativen Bereich. Nach Inkubation mit EGF konnte bei einer Konzentration von 66  $\mu\text{g/ml}$  keine signifikante Änderung des  $\zeta$ -Potentials gemessen werden (Tab. 3.2). Das bedeutet, dass eine Inkubation mit EGF keine Auswirkungen auf die negative Ladung oder die Stärke der Ladung der Partikel hatte. Der humane EGF besitzt in seiner Proteinsequenz neun negativ und sechs positiv geladene Aminosäuren. Das bedeutet, dass die Ladung von EGF in wässriger Umgebung eine negative Gesamtladung hat. Laut Taylor *et al.* (1972) hat humanes EGF einen isoelektrischen Punkt von  $\text{pH} = 4,6$ , sodass auch keine Änderungen des Vorzeichens des  $\zeta$ -Potentials der Partikel durch die Anwesenheit von EGF in wässriger Umgebung erwartet wurden.



**Abbildung 3.12: Größenverteilung der SiNP ohne und mit Zugabe von EGF.** Die Si80 wurden mit Milli-Q-Wasser auf 66  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und der hydrodynamische Durchmesser in Anwesenheit von EGF [100 ng/ml] bestimmt.

Die mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen hydrodynamischen Durchmesser der kolloidalen Silikapartikel in den Stammlösungen (ohne EGF) entsprachen dem Durchmesser, der über TEM-Aufnahmen ermittelt wurde (Tabelle 3.1). Um die Daten mit und ohne EGF vergleichen zu können, wurden die hydrodynamischen Durchmesser der Si80 Partikel in der Konzentration 66  $\mu\text{g/ml}$  über die Intensitätsverteilung bestimmt. Die hydrodynamischen Durchmesser der Si15 und Si25 Partikel können in der geringen Konzentration mit dieser Methode nicht aussagekräftig bestimmt werden. In der Konzentration 66  $\mu\text{g/ml}$  konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von EGF keinen messbaren Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Si80 Partikel hatte (Tabelle 3.2 und Abb. 3.12). Jedoch war der mittlere Durchmesser etwa doppelt so groß wie in den Stammlösungen.

### 3.7.2 Berechnungen zu den Verhältnissen zwischen SiNP und EGF

Die folgenden Berechnungen wurden durchgeführt, um abzuschätzen, in welchem Verhältnis EGF-Moleküle und Partikel unter den Versuchsbedingungen [100 ng/ml EGF; 33 µg/ml Partikel] vorliegen. Als Grundlage für die Berechnungen wurden die Daten der Chargen FD15-B\_scw.01 für Si15 Partikel, Fd25-K\_scw für Si25 Partikel und Fd80-H\_scw\_01\_8h für Si80 Partikel verwendet.

**EGF:** Pro Versuchsansatz wurden 200 ng EGF in einem Volumen von 2,09 ml eingesetzt. Das entspricht bei einem Molekulargewicht des EGF von 6,2 kDa einer Stoffmenge von 67,07 nmol EGF.

#### Si15:

$$(66,6 \mu\text{l Partikelsuspension}) \times (3,250 \mu\text{mol Partikel } \mu\text{l}^{-1}) = 216,45 \mu\text{mol}$$

$$\text{Stoffmenge der Partikel im Ansatz: } 2,0866 \text{ ml} \rightarrow 103,7 \text{ nmol}$$

$$= 103,7 \text{ nmol Nanopartikel im Ansatz} \rightarrow \text{Verhältnis [EGF:Partikel]} = \mathbf{1 : 1,5}$$

#### Si25:

$$(66,6 \mu\text{l Partikelsuspension}) \times (0,43925 \mu\text{mol Partikel } \mu\text{l}^{-1}) = 29,25 \mu\text{mol}$$

$$\text{Stoffmenge der Partikel im Ansatz: } 2,0866 \text{ ml} \rightarrow 14,01 \text{ nmol}$$

$$= 14,01 \text{ nmol Nanopartikel im Ansatz} \rightarrow \text{Verhältnis [EGF:Partikel]} = \mathbf{4,8 : 1}$$

#### Si80:

$$(66,6 \mu\text{l Partikelsuspension}) \times (0,002698 \mu\text{mol Partikel } \mu\text{l}^{-1}) = 0,18 \mu\text{mol}$$

$$\text{Stoffmenge der Partikel im Ansatz: } 2,0866 \text{ ml} \rightarrow 0,086 \text{ nmol}$$

$$= 0,086 \text{ nmol Nanopartikel im Ansatz} \rightarrow \text{Verhältnis [EGF:Partikel]} = \mathbf{780 : 1}$$

Die Berechnungen zeigten, dass die Si15 Partikel in einem größeren molaren Verhältnis im Vergleich zum EGF vorlagen und deutlich weniger Si25 und Si80 Partikel als EGF vorhanden waren.

### 3.8 Darstellung der Interaktion von EGF und SiNP mittels Gelelektrophorese

Mit den folgenden Versuchen wurde mittels Gelelektrophorese die Fähigkeit der SiNP untersucht, den Wachstumsfaktor EGF auf ihrer Oberfläche zu binden. Bei diesem Versuch wurden die kleinsten (Si15) und die größten (Si80) Partikel miteinander verglichen.

In einem ersten Versuch (Abb. Gel A) wurden Si15 und Si80 Partikel in 2 ml H<sub>2</sub>O mit EGF [100 ng/ml] für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch eine Membran (100 kDa) zentrifugiert [14.000 x g]. Die Ausschlussgröße der Membran hält die Si15 und Si80 zurück, jedoch kann freies EGF (grüne Banden) passieren und im Filtrat nachgewiesen werden. Da sich die spezifischen Oberflächen der Si15 und Si80 Partikel stark unterscheiden (Kapitel 2.14.2), wurden neben der gleichen Massenkonzentration der Partikel (Spalte 5 und 6) auch Ansätze erstellt, bei denen die Konzentration der Si15 und Si80 Partikel so angepasst wurde, dass eine vergleichbare Oberfläche eingesetzt wurde (Spalte 1 und 2: 41,6 m<sup>2</sup>/g (wie Si80); Spalte 3 und 4: 222 m<sup>2</sup>/g (wie Si15)). In der Spalte 7 wurde als Kontrolle EGF ohne SiNP durch die Membran zentrifugiert, und in der Spalte 8 wurde unbehandeltes EGF aufgetragen. Die Konzentration beider EGF-Kontrollen war, wie in den anderen Versuchen, 100 ng/ml. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration adsorbierte ein signifikanter Anteil des EGFs an der Membran und konnte nicht mehr in dem Filtrat detektiert werden (Spalte 7). Die Menge an freiem EGF dieser Probe 7 unterschied sich nicht von der Intensität der Bande, bei der EGF mit Si80 Partikeln [66 µg/ml] inkubiert wurde (Spalte 6). Das bedeutet, dass die Si80 Partikel die Menge an freiem EGF nicht reduzieren. Wenn EGF mit der gleichen Massenkonzentration an Si15 Partikeln inkubiert wurde, war in dem Filtrat kein EGF mehr nachweisbar. Bei angeglicherer Oberfläche der Si15 und Si80 Partikel näherten sich die Effekte an, sodass die Bande in der Spalte 4 (Si80, Oberfläche wie Si15) schwächer wurde bzw. in der Spalte 1 (Si15, Oberfläche wie Si80) eine schwache Bande zu erkennen ist. Das bedeutet, dass EGF im wässrigen Milieu an die SiNP bindet und die Stärke dieses Effekts mit der Oberfläche der Partikel korreliert. Bei den roten Banden (in den Abbildungen 3.13.1 unterhalb der EGF-Banden) handelte sich um freien Atto647-Farbstoff, der sich aus den Partikeln gelöst hatte.

In dem folgenden Szenario (Gel B1 und B2, Abb. 3.13.1) wurden die Partikel in Serum-reduziertem Medium mit EGF inkubiert, um festzustellen, ob die Bindung auch in Anwesenheit der Serum-Proteine nachweisbar ist bzw. um die Übertragbarkeit des Befundes

auf die Bedingungen des Zellexperiments zu prüfen. Das Verhältnis zwischen Medium, Partikeln und EGF entsprach den Bedingungen der zellulären Experimente. Auch in diesem Versuch wurden die Ansätze nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur durch eine 100 kDa Membran zentrifugiert. In beiden Gelen (B1, B2) wurde in der ersten Spalte Serum-reduziertes Medium aufgetragen, um eine Eigenfluoreszenz der Medium-Bestandteile auszuschließen. In der Spalte 2 wurde EGF-L in H<sub>2</sub>O und in der Spalte 3 wurde EGF-L in Serum-reduziertem Medium durch die Membran zentrifugiert (B1), während diese Ansätze im Gel B2 nicht zentrifugiert wurden. Es war zu erkennen, dass, bei der gleichen Anregungszeit der Gele, die nicht zentrifugierten Proben intensivere Banden aufwiesen. In der Spalte 4 und 5 des Gels B1 wurde EGF-L mit Si15 Partikeln bzw. Si80 Partikeln in gleicher Masse-Konzentration zentrifugiert. Wie im Gel A wurde EGF-L von den Si15 Partikeln gebunden und durch die Membran zurückgehalten, während die Si80 nur einen Teil des EGF-Ls binden, was durch eine hellere Bande deutlich wurde. In Spalte 6 und 7 (Gel B1) wurden Proben aufgetragen, bei denen die Si15 Partikel bzw. Si80 Partikel mit gleicher Oberfläche (wie Si80) eingesetzt wurden. Die Bande des freien EGFs wurde deutlich stärker, wenn die Oberfläche der Si15 Partikel reduziert wurde. Wenn die Oberfläche der Si80 Partikel an die Oberfläche der Si15 Partikel angeglichen wurde (Spalte 4 und 5, B2), konnte keine Bindung des EGFs an der vergrößerten Oberfläche der Si80 Partikel beobachtet werden. Die Bande war nicht schwächer als die Bande einer zentrifugierten Probe EGF-L ohne SiNP (Spalte 6, B2). Dieses Ergebnis sagt aus, dass EGF auch in Anwesenheit von Serumproteinen die Si15 Partikel bindet. Als Ursache für diesen Effekt konnte der Einfluss der spezifischen Oberfläche der Si15 Partikel identifiziert werden.

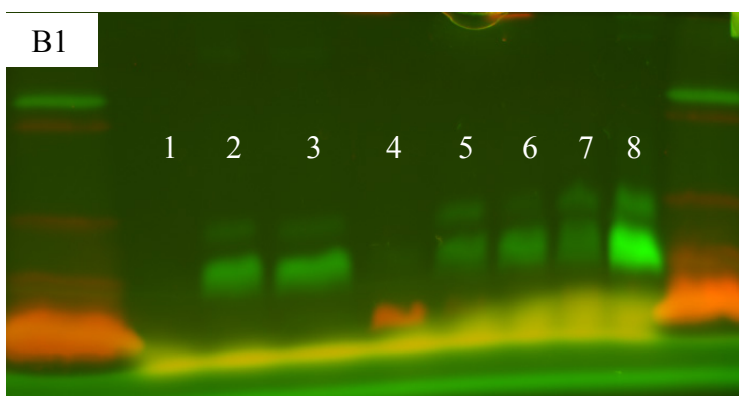
In einem parallelen Experiment wurde die Bindung von EGF auf der Partikeloberfläche nicht durch Ultrafiltration, sondern durch Sedimentation der Partikel untersucht. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass die Adsorption des freien EGFs an der Filtrationsmembran ausbleibt. Die Proben wurden daher bei 16.824 x g für 30 min zentrifugiert, sodass die Si80 Partikel sedimentiert wurden. Für eine Sedimentation der Si15 Partikel ist die Trägheit, die Reibung und der Auftrieb der Partikel zu groß bzw. unter den gewählten Bedingungen konnten die Partikel nicht qualitativ abgetrennt werden. Als interne Kontrolle wurden in Spalte 1 und 2 (Gel C) zentrifugiertes und nicht zentrifugiertes EGF aufgetragen. Ein Unterschied zwischen diesen Behandlungen war nicht erkennbar. In Spalte 3 und 4 wurden EGF-Proben aufgetrennt, die mit Si15 bzw. Si80 Partikel inkubiert und anschließend zentrifugiert wurden. Während die Si80 Partikel wie erwartet sedimentiert wurden, konnten die Si15 in Gel nachgewiesen werden. Ein Teil der Si15 waren der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel erkennbar, und

ein Teil der Partikel befand sich am Boden der Proben-Tasche im Sammelgel. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um agglomerierte oder einzelne Partikel, die zu groß sind, um durch das Sammelgel zu wandern. In Spalte 5 und 6 wurden die Partikel Si15 und Si80 aufgetragen, die ohne EGF zentrifugiert wurden. Die Si80 Partikel konnten jetzt auch am Boden der Gel-Tasche detektiert werden, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Si80 Partikel durch die Abwesenheit von EGF schlechter sedimentiert werden konnten. In den DLS-Messungen (Kapitel 3.7.1) wurde beobachtet, dass sich die Si80 Partikel in zu Agglomeraten von zwei Partikeln zusammenlagern. Unter den Inkubationsbedingungen dieses Ansatzes, d.h. in Serum-reduziertem Medium, könnte daher eine Agglomeration der Si80 Partikel begünstigt werden. Bei den Untersuchungen in Wasser konnte dieser Befund nicht beobachtet werden. In Spalte 7 und 8 wurden die Partikel-EGF Gemische nicht zentrifugiert. Dabei ist die EGF-Bandenstärke der Probe mit Si15 Partikel schwächer als die der Si80 Partikel ausgeprägt. In der Abbildung 3.13.2 wurden die Banden des Gels C quantifiziert und als Balkendiagramm dargestellt, wodurch die Unterschiede zwischen den Banden der Proben besser sichtbar sind. Das Balkendiagramm unterstützt die Hypothese, dass die Menge an freiem EGF durch die Si15 Partikel reduziert wird, während die Si80 Partikel in Anwesenheit von Serum keinen signifikanten Einfluss auf die EGF-Menge hatten.

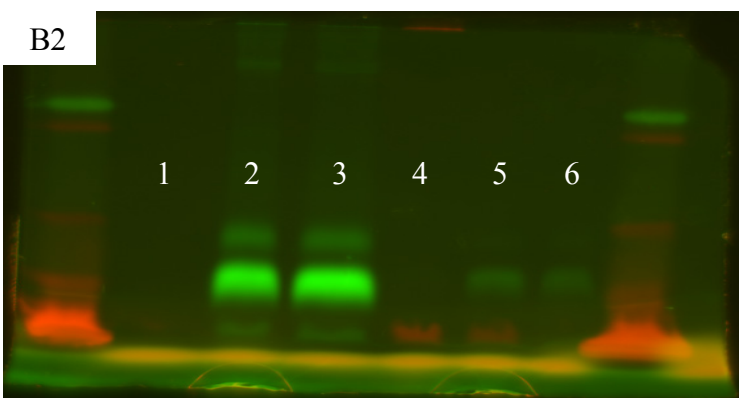
Zusammenfassend zeigen diese Experimente in Wasser und Serum-reduziertem Medium, dass EGF unter beiden Bedingungen an die Si15 Partikel gebunden hat. Dieser Effekt scheint abhängig von der Partikeloberfläche zu sein, denn durch Anpassung der Oberfläche der Si80 Partikel wurde ebenfalls die Menge an freiem EGF in Wasser und in Serum-reduziertem Medium reduziert. In den folgenden Versuchen wurde die Interaktion zwischen SiNP, EGF und dem EGFR fluoreszenzmikroskopisch untersucht.



- 1: **Si15 + EGF-L** } Oberfläche wie Si80  
 2: **Si80 + EGF-L** } (41,6 m<sup>2</sup>/g)  
 3: **Si15 + EGF-L** } Oberfläche wie Si15  
 4: **Si80 + EGF-L** } (222 m<sup>2</sup>/g)  
 5: **Si15 + EGF-L** } Gleiche Masse  
 6: **Si80 + EGF-L** } (33 µg/ml)  
 7: **EGF-L**  
 8: **EGF-L** (nicht zentrifugiert)



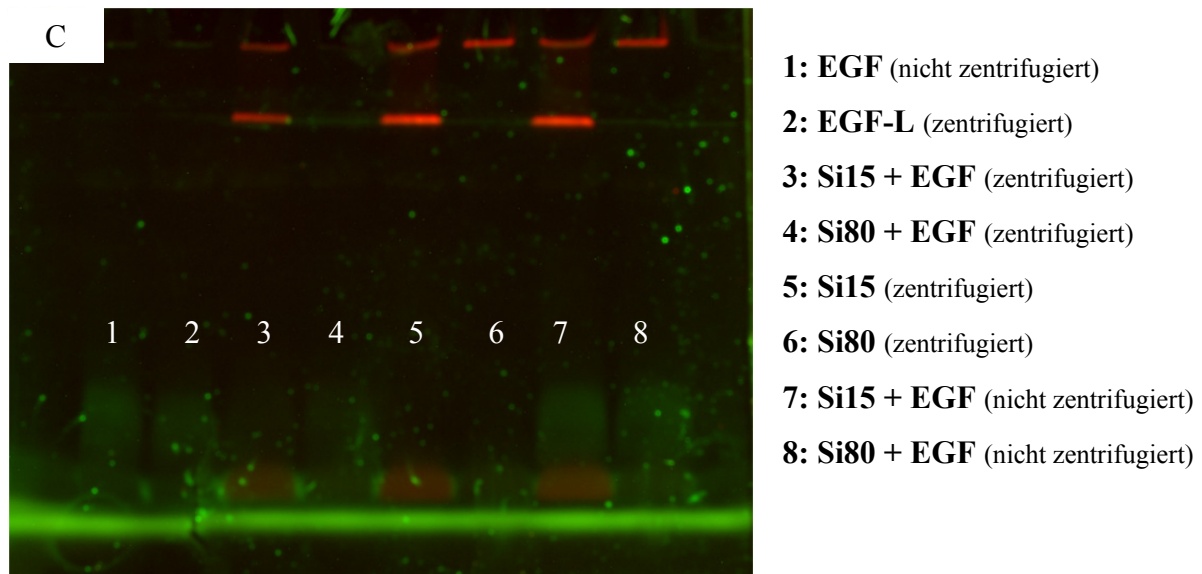
- 1: **Medium** (zentrifugiert)  
 2: **EGF-L** (zentrifugiert)  
 3: **Medium + EGF-L** (zentrifugiert)  
 4: **Si15 + EGF-L** } Gleiche Masse  
 5: **Si80 + EGF-L** } (33 µg/ml)  
 6: **Si15 + EGF-L** } Oberfläche wie Si80  
 7: **Si80 + EGF-L** } (41,6 m<sup>2</sup>/g)  
 8: **EGF-L** (nicht zentrifugiert)



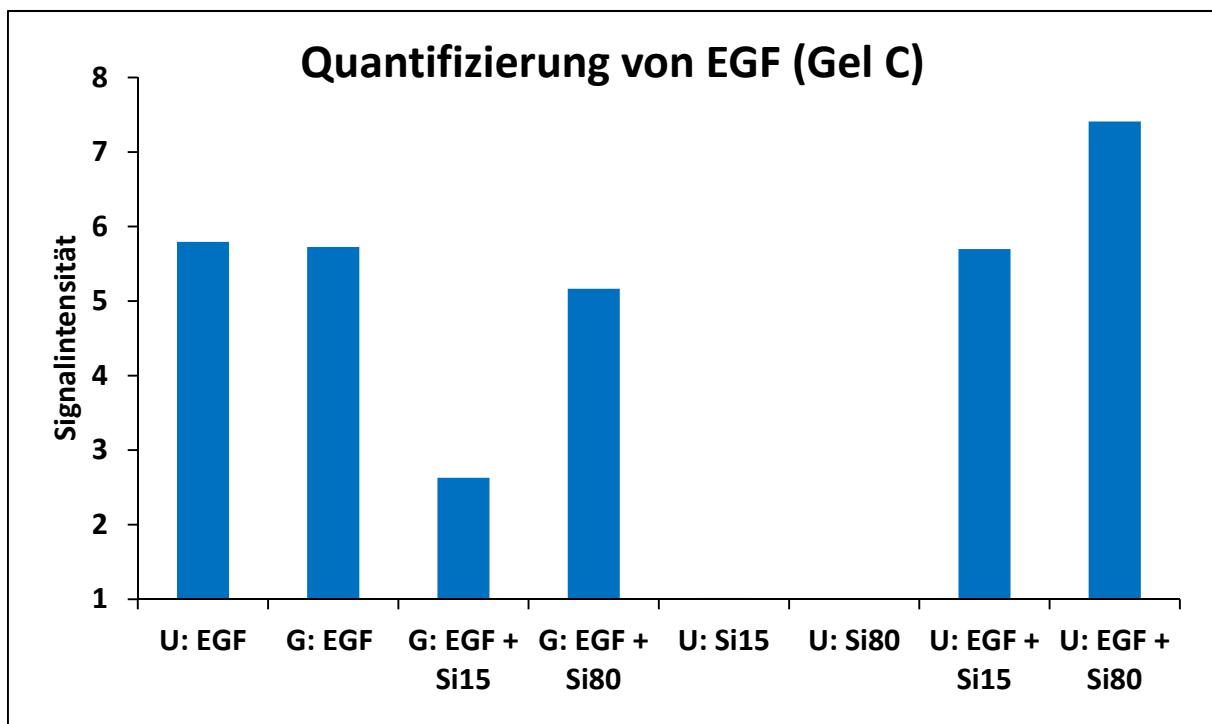
- 1: **Medium** (nicht zentrifugiert)  
 2: **EGF-L** (nicht zentrifugiert)  
 3: **Medium + EGF-L** (nicht zentrifugiert)  
 4: **Si15 + EGF-L** } Oberfläche wie Si15  
 5: **Si80 + EGF-L** } (222 m<sup>2</sup>/g)  
 6: **EGF-L** (zentrifugiert)

→





**Abbildung 3.13.1: Interaktion zwischen EGF und SiNP in H<sub>2</sub>O und Serum-reduziertem Medium.** SiNP wurden für 30 min mit EGF-L in H<sub>2</sub>O bzw. Serum-reduzierten Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben durch eine 100 kDa-Membran filtriert bzw. wurden die SiNP per Zentrifugation sedimentiert. Auf das Gel wurde das Filtrat bzw. der Überstand aufgetragen. **A:** in H<sub>2</sub>O; 100 kDa Membran; Auftragung des Durchflusses; **B1, B2:** in Serum-reduziertem Medium; 100 kDa; Auftragung des Durchflusses **C:** in Serum-reduzierten Medium; Sedimentation bei 16000 x g; Auftragung des Überstandes. Grün: EGF-L; rot: SiNP. Jedes Gel wurde einmal durchgeführt.



**Abbildung 3.13.2: Quantifizierung der EGF-Menge (Gel C) in Serum-reduziertem Medium.** SiNP wurden für 30 min mit EGF-L in H<sub>2</sub>O bzw. Serum-reduzierten Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 16824 x g zentrifugiert. Die Banden wurden mit ImageJ quantifiziert. (U = nicht zentrifugiert; G = zentrifugiert).

### 3.9 Mikroskopische Analysen (Konfokale Laser Raster Mikroskopie)

Mit den folgenden Zell-Experimenten sollte durch qualitative Kolokalisationsanalysen die Hypothese überprüft werden, dass die Silikananopartikel den EGF auf ihrer Oberfläche binden, und es deshalb zu einer Reduktion des Zellwachstums bzw. einer verminderten Phosphorylierung und Translokation des EGFRs kommt. Außerdem sollte der Aufnahmemechanismus der SiNP in die Zellen aufgeklärt und die Lokalisation der SiNP in den Zellen festgestellt werden.

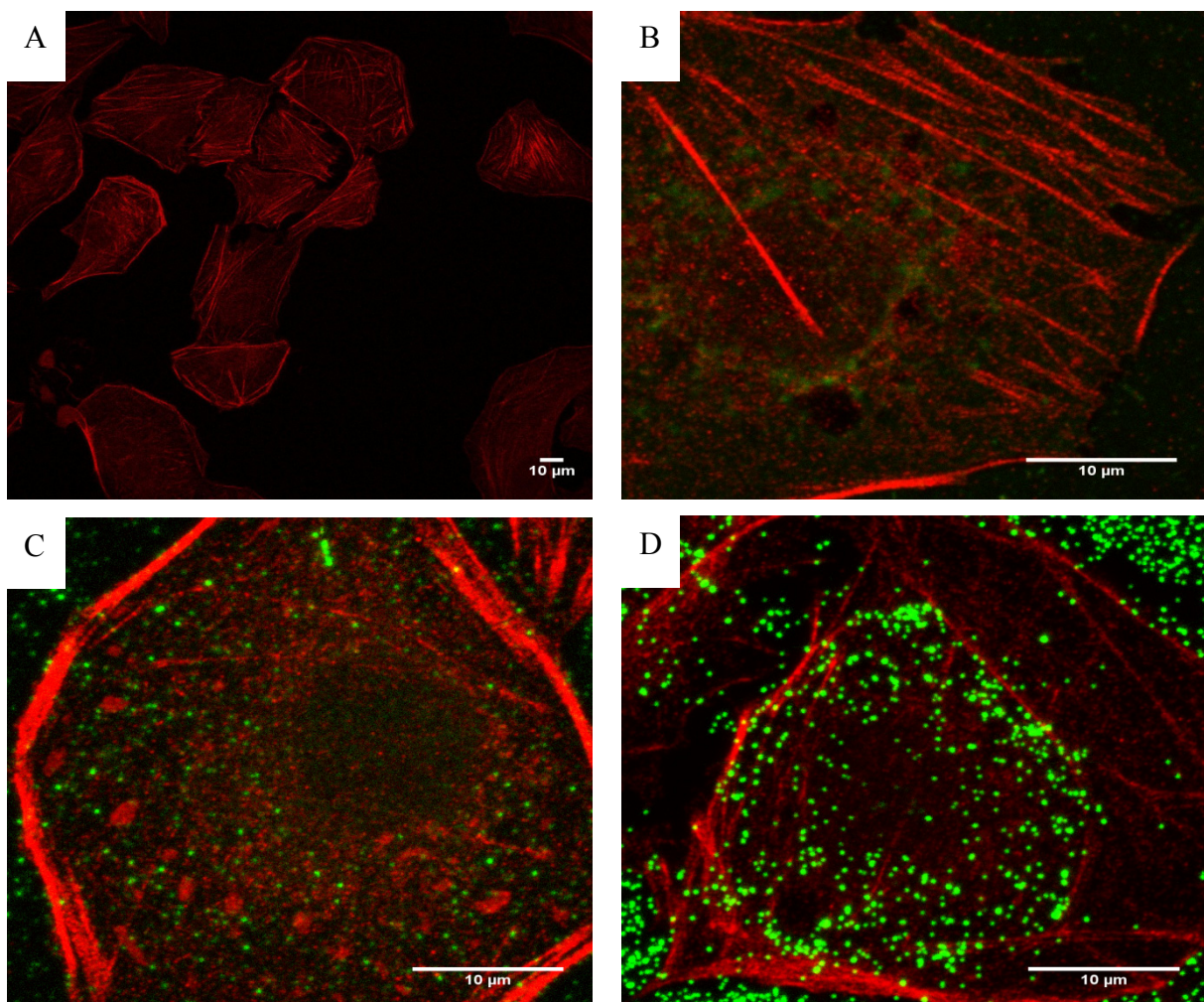
#### 3.9.1 Kolokalisation von Nanopartikeln und dem EGFR

Um zu untersuchen, ob die Effekte auf Zellproliferation sowie Phosphorylierung und Translokation des EGFRs durch eine Bindung der Silikananopartikel an den EGFR auftreten, wurden RLE-Zellen ohne weitere EGF-Zugabe mit den drei fluoreszenten Silikapartikelgrößen (Fd-Serie) für 5 min belastet und im Anschluss eine Immunfärbung des EGFRs durchgeführt. Es wurden dann Bilderstapel repräsentativer Zellen aufgenommen und analysiert. Außerdem wurden die Bilderstapel mit der Software ImageJ zu Maximum-Intensitäts-Projektionen (*engl.* maximum intensity images) verarbeitet. Bei diesem Versuch kann man an den Abbildungen sehen, dass der EGFR ein linienförmiges Muster bildete und besonders starke Signale an der Unterseite und an dem seitlichen Rand der Zellen zu sehen waren.

Eine Analyse der Bilderstapel (siehe Anhang, Kapitel 6.2) zeigte, dass die Partikel nach 5 min Inkubationszeit auf der Oberfläche der Zellen lokalisiert waren, aber nicht mit dem EGFR auf der Zelle kolokalisierten. Es wurden zu diesem Zeitpunkt auch einzelne Partikel innerhalb der Zellen detektiert, die nicht mit internalisiertem EGFR kolokalisieren. Anhand der Maximum-Intensitäts-Projektionen (Abbildung 3.14) sieht man, dass keiner der fluoreszierenden Silikananopartikel (Si15, Si25 und Si80) mit dem EGFR innerhalb oder außerhalb der Zellen interagiert. Auch auf dem Deckglas waren Partikel zu finden, die wahrscheinlich mit den Silanol-Gruppen auf dem Deckglas interagieren. Die Si15 Partikel erschienen auf den Abbildungen 3.14 (B) bei gleichen Aufnahme-Parametern dunkler als die Si25 oder Si80 Partikel. Das liegt daran, dass die größeren Si80 Partikel synthesebedingt mehr Farbstoff enthalten. Es konnte auch gezeigt werden, dass größere vereinzelte Partikel stärker sedimentieren (Peuschel *et al.*, 2015). Außerdem hatten sich die Si15 Partikel in einem fleckenförmigen Muster in der Mitte der Zelloberfläche verteilt. Bei den Signalen der Si25 und Si80 Partikel (C und D) konnte man unterschiedliche Intensitäten erkennen. Es könnte

sein, dass es sich bei den größeren Signalen um Agglomerate und bei den kleineren Signalen um einzelne Partikel handelt, jedoch reichte die Auflösung der Abbildungen nicht aus, um einzelne Partikel getrennt zu detektieren. Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass die kolloidalen Silikananopartikel nach 5 min nicht mit dem EGFR kolokalisieren. Dieser Befund schwächt die Hypothese, dass der EGFR durch eine Bindung der Partikel inhibiert wird. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Si15 Partikel EGFR durch die Sedimentation von im Medium enthaltenen EGF abschirmen.

Das Muster des EGFRs entsprach der Anordnung des Aktin-Zytoskeletts (Abbildung 3.14). In einem weiteren Versuch, der im Anhang unter Kapitel 6.3 aufgeführt ist, wurden der EGFR und das Aktinskelett (Phalloidin488-Färbung) in unbehandelten Zellen gefärbt. Es war zu erkennen, dass die Signale des EGFRs und des Aktins stark am äußeren Rand der Zellen kolokalisierten.



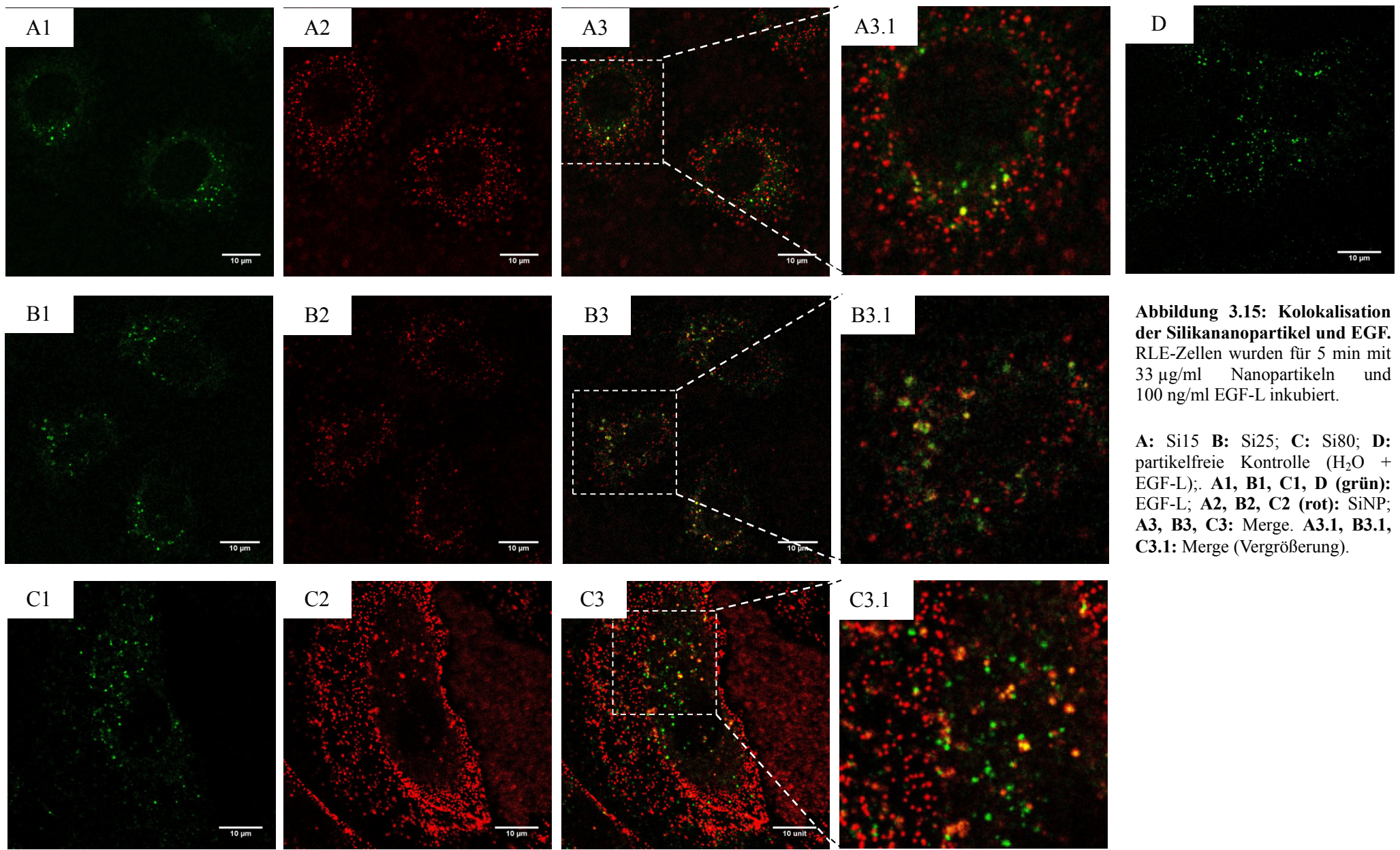
**Abbildung 3.14: Kolokalisation der Silikananopartikel und des EGFRs.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit 33 µg/ml fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln inkubiert und der EGF-Rezeptor gefärbt. Durch die Darstellung der Maximum-Intensitäts-Projektionen wurden alle Ebenen (in Z-Richtung) der Aufnahme in den Abbildungen dargestellt. **A:** Kontrolle (H<sub>2</sub>O); **B:** Si15; **C:** Si25; **D:** Si80. Grün: Silikananopartikel; rot: EGFR.

### 3.9.2 Kolokalisation von Nanopartikeln und EGF

Bei vorherigen Experimenten (Kapitel 3.7) wurde festgestellt, dass vor allem die Si15 Silikapartikel in einem zellfreien System mit EGF interagieren und den Wachstumsfaktor auf ihrer Oberfläche binden. Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob die SiNP auch in dem zellulären System der RLE-Zellen mit EGF interagieren und ob dieser Partikel-EGF Komplex von den RLE-Zellen aufgenommen wird.

Für diesen Versuch wurden RLE-Zellen auf Deckgläsern kultiviert und am folgenden Tag mit Serum-reduziertem Medium inkubiert. Nach 24 h wurden zuerst SiNP (Fd-Serie) zu den Zellen gegeben und unmittelbar danach das markierte EGF. Das EGF wurde nicht vor den Partikeln zu den Zellen gegeben, weil in dem Experiment zur Translokation des EGFRs (Kapitel 3.6) herausgefunden wurde, dass eine Zugabe von EGF vor den Partikeln den EGFR-Signalweg aktiviert und der reduzierende Partikeleffekt auf die EGFR-Signalkaskade nicht eintritt. Nach 5 min Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, fixiert und die Proben auf Objektträgern eingebettet. Bei den Abbildungen 3.15 handelt es sich um Maximum-Intensitäts-Projektionen aufgenommener Bildstapel. Die H<sub>2</sub>O-Kontrolle (Abbildung D; 3.15) zeigt die Verteilung von EGF in nicht mit Partikeln belasteten Zellen. Der EGF befindet sich in vesikelartigen Strukturen im gesamten intrazellulären Bereich, jedoch nicht im Zellkern. In der ersten Spalte wurden die Abbildungen des grünen 488-Kanals (EGF) nach Belastung mit SiNP (A1: Si15; B2: Si25; C1: Si80) aufgeführt. In der mittleren Spalte wurden die Abbildungen des roten 633-Kanals (A2: Si15; B2: Si25; C2: Si80) dargestellt, mit denen die Silikapartikel detektiert wurden. In der rechten Spalte wurden die Abbildungen der beiden Kanäle überlagert (Merge-Bilder), sodass die gelben Bereiche der Abbildungen eine Kolokalisation zwischen SiNP und EGF anzeigen. Es wurde beobachtet, dass sowohl EGF (A1, B1, C1) als auch SiNP (A2, B2, C2) in vesikelartigen Zelleinschlüssen internalisiert wurden. Weil unter diesen Versuchsbedingungen der EGFR nicht translozierte, liegt es Nahe, dass dieser Teil des EGFs EGFR-unabhängig internalisiert wurde. Außerdem konnten auch SiNP detektiert werden, die sich auf der Oberfläche der Zellen befanden. Im Vergleich zu den grünen EGF-Signalen überwiegen die roten Signale der SiNP bei allen drei Partikelgrößen trotz des geringeren molaren Verhältnisses der größeren Partikel zu der Menge an EGF. Das bedeutet, dass nur ein kleiner Teil des freien EGFs internalisiert wird. Anhand der Merge-Bilder sieht man, dass es neben gelben Signalen, bei denen EGF und SiNP kolokalisieren, auch EGF- bzw. SiNP-Signale existieren, die nicht mit einander kolokalisieren (A3/A3.1,

B3/B3.1, C3/C3.1). Dieses Ergebnis bestätigte den Befund aus Kapitel 3.7, dass die SiNP den EGF binden, und zeigt, dass der Partikel-EGF Komplex von RLE-Zellen aufgenommen wird.



**Abbildung 3.15: Kolokalisation der Silikananopartikel und EGF.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln und 100 ng/ml EGF-L inkubiert.

**A:** Si15 **B:** Si25; **C:** Si80; **D:** partikelfreie Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$  + EGF-L); **A1, B1, C1, D (grün):** EGF-L; **A2, B2, C2 (rot):** SiNP; **A3, B3, C3:** Merge. **A3.1, B3.1, C3.1:** Merge (Vergrößerung).

### 3.9.3 Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln

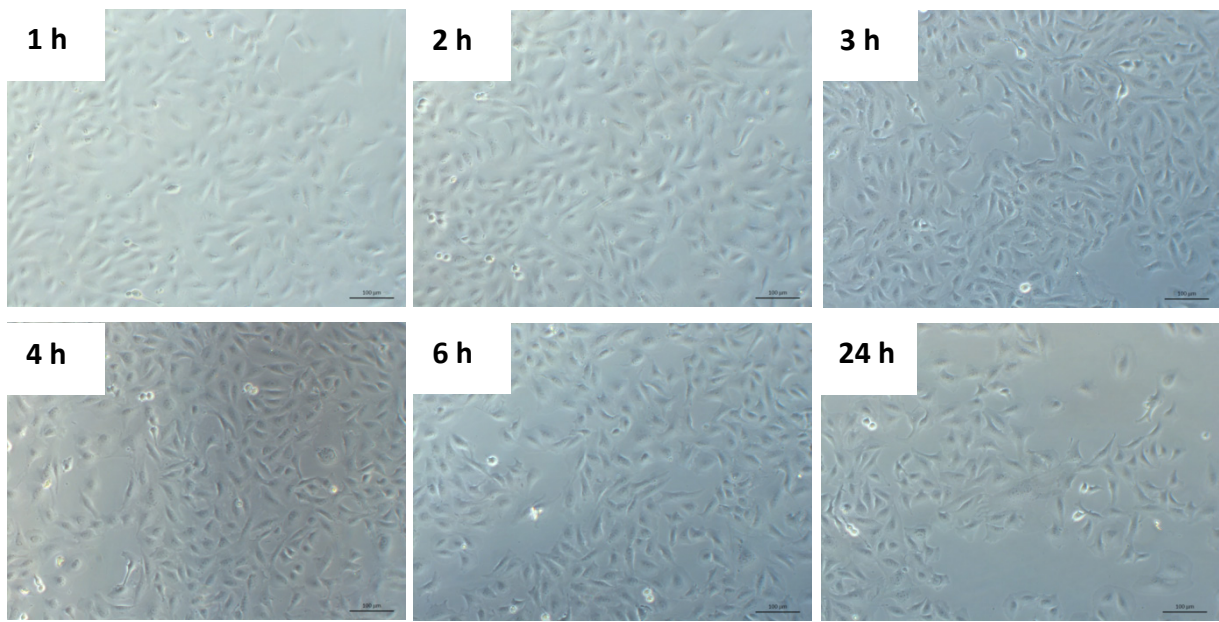
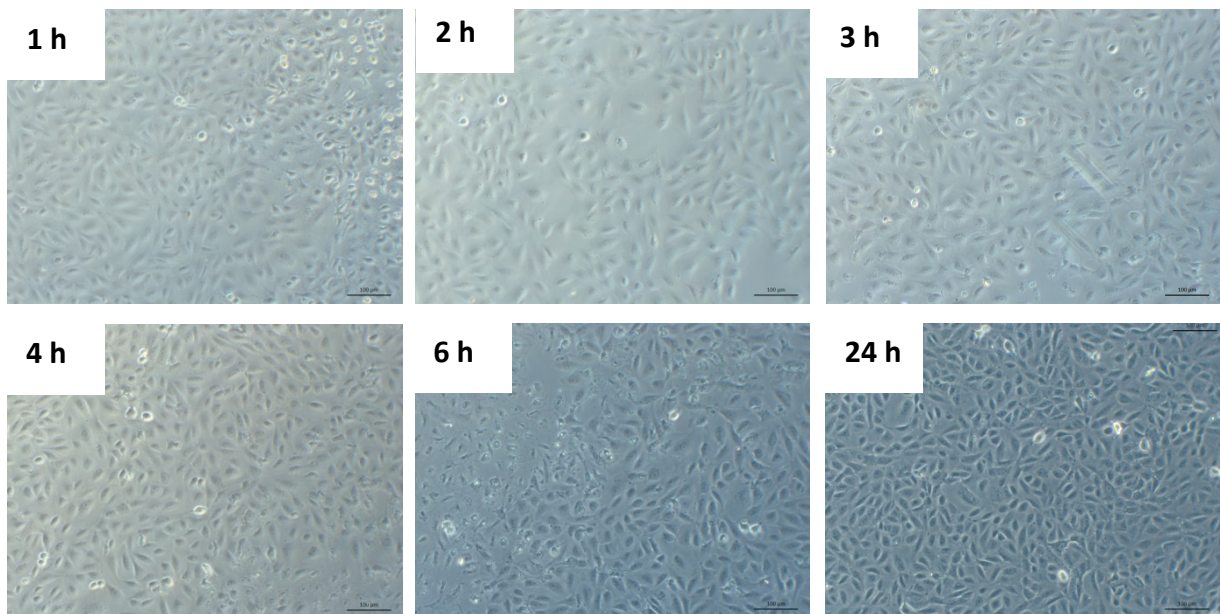
In den folgenden Versuchen sollte der Aufnahmemechanismus, mit dem die Silikananopartikel in RLE-Zellen gelangen, identifiziert werden. Außerdem sollte geklärt werden, in welchen Zellkompartimenten die Nanopartikel deponiert werden.

#### 3.9.3.1 Aufnahmemechanismus von SiNP in RLE-Zellen

Eine aktive Aufnahme von Nanopartikeln in Epithel-Zellen über Clathrin-vermittelte Endozytose wurde von Kim *et al.* im Jahre 2006 beschrieben. In anderen Literaturstellen wurde publiziert, dass Nanopartikel über Caveolin-abhängige Aufnahmewege (Dausend, 2008) oder über Makropinozytose (Harush-Frenkel, 2007) internalisiert werden können. Um zu klären, wie die Silikananopartikel von RLE-Zellen aufgenommen werden, wurden zwei verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Chlorpromazin (C) unterdrückt die Bindung von Clathrin an den AP2-Adaptorkomplex und so die Bindung von Clathrin an die Membran. Filipin III (im Folgenden als Filipin oder F bezeichnet) verändert die Zusammensetzung der Membran durch Depletion von Cholesterin und verhindert so die Entstehung von Caveolae. Um auszuschließen, dass bei Inhibierung eines Aufnahmeweges die Nanopartikel über alternative Endozytose-Wege internalisiert werden, wurde auch eine Mischung beider Inhibitoren (C/F) eingesetzt.

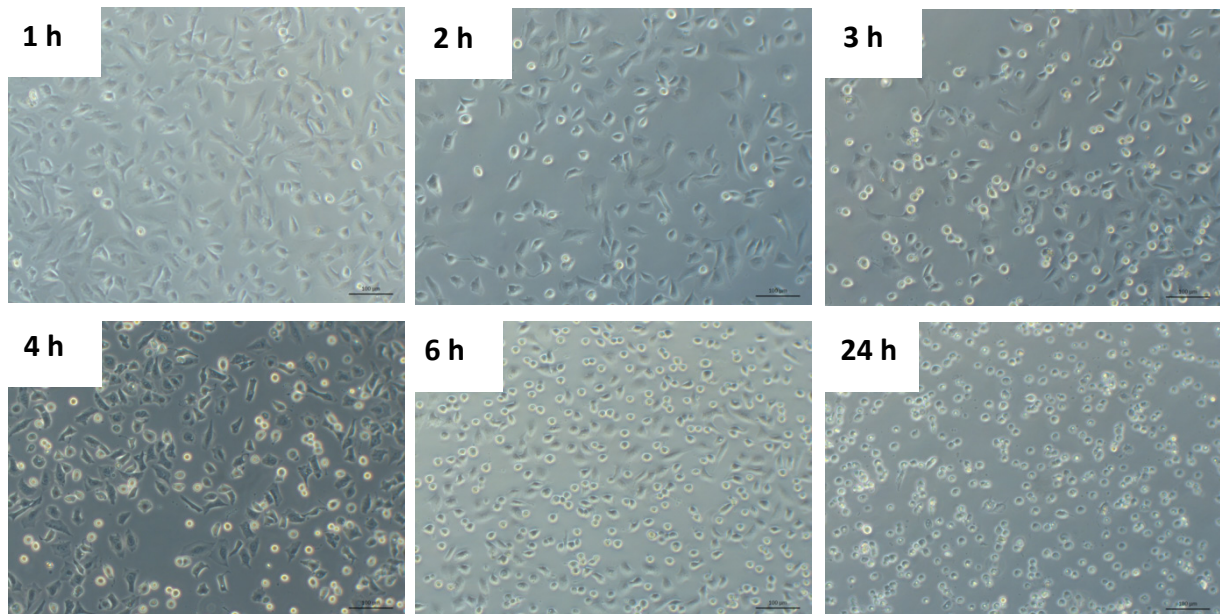
#### 3.9.3.2 Findung der Inkubationszeit für die Inhibitoren

In einem Vorversuch zur Findung der Inkubationszeit der Inhibitoren wurden RLE-Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren bzw. H<sub>2</sub>O als Kontrolle inkubiert und die morphologische Beschaffenheit der Zellen nach den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 3.16). Die mit Filipin (7 µM) behandelten Zellen zeigten nach 24 Stunden im Vergleich mit den Kontroll-Zellen keine morphologische Veränderung. Nach einer Inkubation mit Chlorpromazin (50 µM) und mit der Mischung aus Chlorpromazin und Filipin wurde nach einer Stunde ein Abrunden weniger Zellen beobachtet, die nach 24 Stunden bei allen Zellen zu sehen war. Ein Ablösen der Zellen aus der Kulturschale konnte nach 24 Stunden nicht beobachtet werden. Nach 4 Stunden waren etwa 50% der Zellen abgerundet, sodass die Zellen im folgenden Versuch eine halbe Stunde mit den Inhibitoren vorinkubiert und mit SiNP für weitere 4 h belastet wurden.

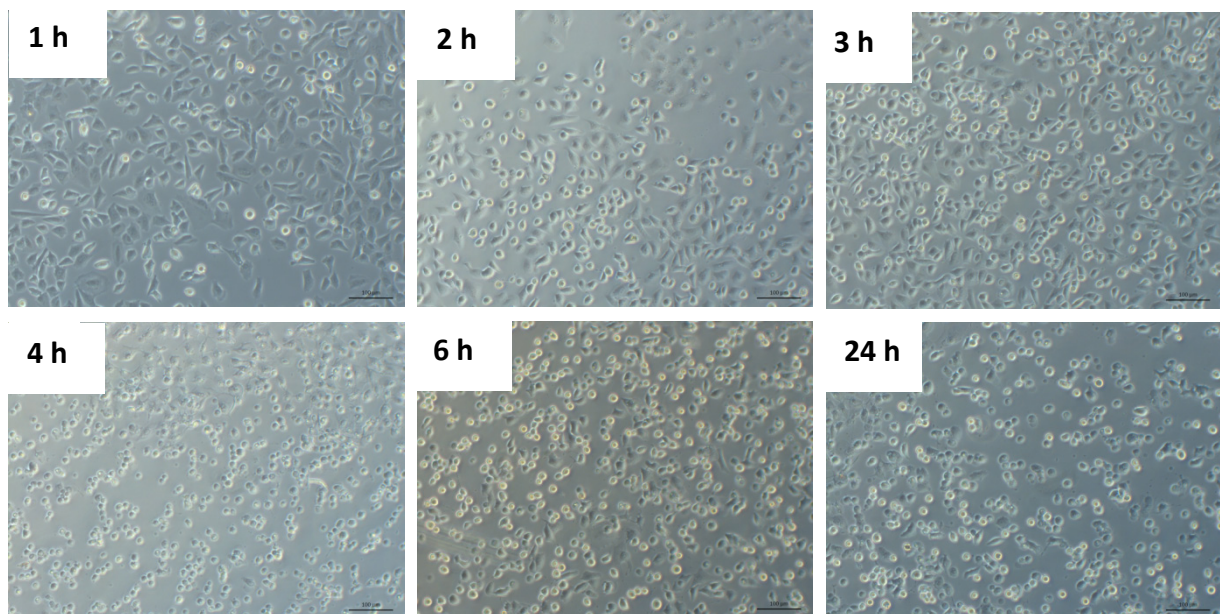
**A: Kontrolle (H<sub>2</sub>O)****B: Filipin**



**C: Chlorpromazin**



**D: Chlorpromazin/ Filipin**



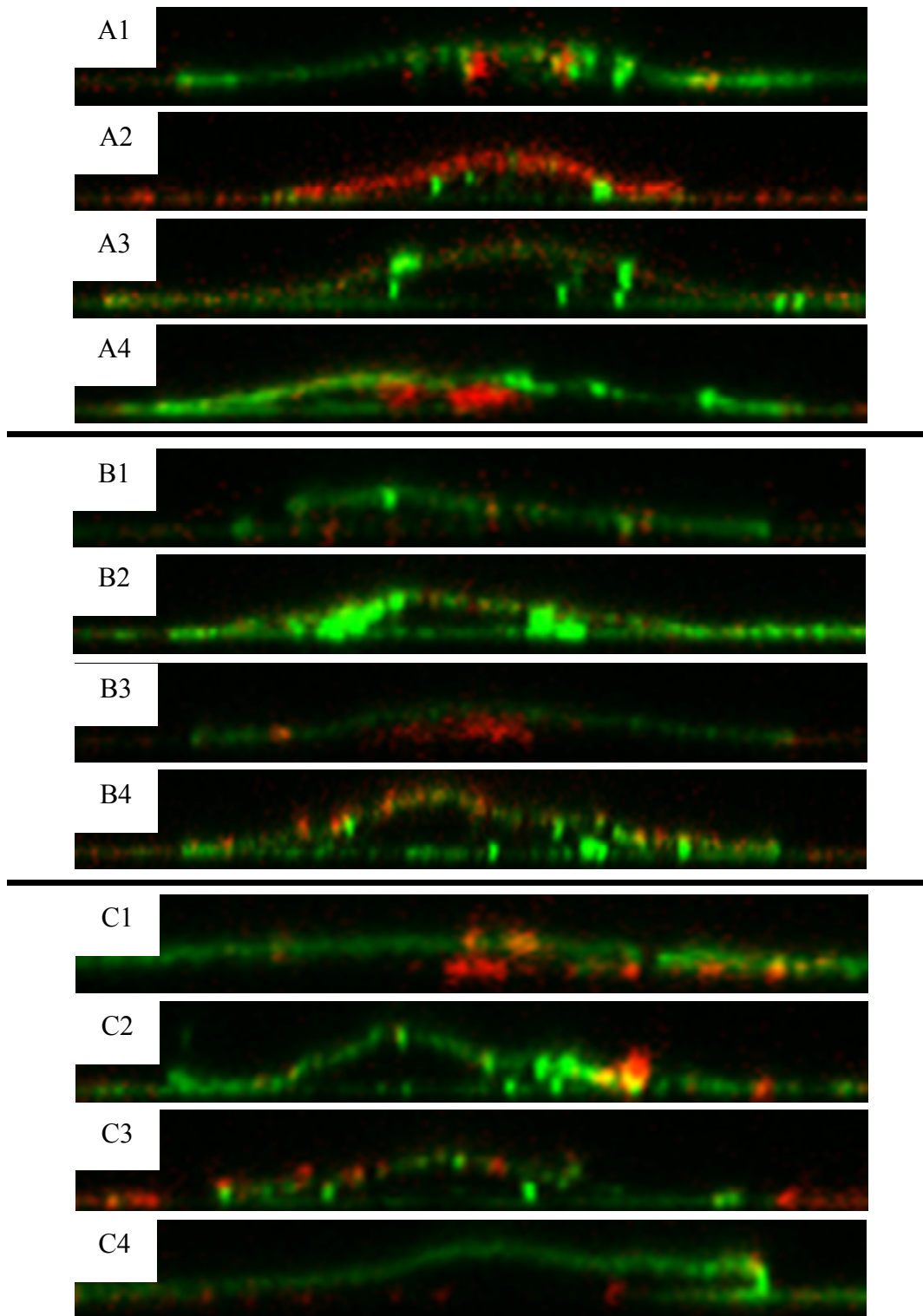
**Abbildung 3.16: Morphologische Zellveränderungen nach Belastung mit Inhibitoren.** RLE-Zellen wurden mit den Inhibitoren inkubiert und die Morphologie der Zellen mit einem Lichtmikroskop nach 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden überprüft. **A:** Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ); **B:** Filipin (7  $\mu\text{M}$ ); **C:** Chlorpromazin (50  $\mu\text{M}$ ); **D:** Chlorpromazin/Filipin (50  $\mu\text{M}$ /7  $\mu\text{M}$ );

### 3.9.3.3 Inhibierung der Nanopartikel-Aufnahme

Nachdem RLE-Zellen für eine halbe Stunde mit den Inhibitoren bei 37 °C inkubiert wurden, erfolgte eine 4 stündige Inkubation mit Fluoreszenz-markierten Nanopartikeln. Während in den vorherigen Versuchen nach 5 min Belastungszeit nur vereinzelte SiNP von den Zellen internalisiert wurden, war die Anzahl von internalisierten Nanopartikeln in unbehandelten Zellen nach 4 h groß genug, um einen Effekt der Inhibitoren mikroskopisch zu analysieren. Nach der Belastungszeit wurden die Zellen gewaschen, fixiert und eine Membran-Färbung mit Atto488-gekoppeltem WGA (*engl.* wheat germ agglutinin, siehe 2.3.4.3) durchgeführt. Dann wurden die Zellen auf einem Objektträger eingebettet und am konfokalen Laser-Rastermikroskop analysiert. Aus Bildstapeln, die sich über die gesamte Höhe der Zelle erstrecken, wurden orthogonale Ansichten (XZ- oder in YZ-Ausrichtung der Stapel) angefertigt, sodass internalisierte Partikel von Partikeln auf der Zelloberfläche unterschieden werden konnten (Abb. 3.17).

RLE-Zellen, die mit H<sub>2</sub>O vorbehandelt wurden, haben die jeweiligen kolloidalen Silikananopartikel (Si15, Si25, Si80) vermutlich über Endozytose nach 4 Stunden internalisiert. Nur wenige Partikel liegen oberhalb der WGA-Färbung auf der Membran der Zellen (Abb. 3.17; A1, B1, C1). Auch nach der Vorbehandlung mit dem Inhibitor Filipin (A4, B4, C4) waren internalisierte Partikel innerhalb der Zellen zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle konnte keine erkennbare Reduzierung der Partikelmengen durch die Behandlung mit Filipin detektiert werden. Nach Behandlung der Zellen mit Chlorpromazin (A2, B2, C2) bzw. Chlorpromazin und Filipin (A3, B3, C3) konnten in den Zellen keine Nanopartikel detektiert werden, sondern die Partikel akkumulierten auf den Zellen an der äußeren Membran und befinden sich in der Nähe der WGA-Färbung. Durch die Inkubation mit Chlorpromazin rundeten sich die Zellen ab (Kapitel 3.10.1.). Das hatte Auswirkungen auf die Höhe der Zelle, die nach dem Einbetten bei etwa 5 µm in Z-Ausrichtung lag. Bei der H<sub>2</sub>O-Kontrolle waren die Zellen etwa 3-4 µm hoch.

Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Silikapartikel nicht über Caveolin, sondern über Clathrin-vermittelte Endozytose in die RLE-Zellen aufgenommen wurden. In dem folgenden Versuch wurden frühe Endosomen nach Inkubation mit markierten Partikeln angefärbt. Dadurch sollte die Hypothese bestätigt werden, dass die SiNP in Membranvesikeln der RLE-Zellen vorlagen.



**Abbildung 3.17: Aufnahmemechanismus der Silikananopartikel.** RLE-Zellen wurden für 30 min mit den Inhibitoren Chlorpromazin [50  $\mu\text{M}$ ] und Filipin [7  $\mu\text{M}$ ] inkubiert und dann für 4 h mit 33  $\mu\text{g/ml}$  SiNP belastet. Die repräsentativen Bilder sind orthogonale Darstellungen von Bilderstapeln. Grün: Membran-Färbung mit WGA; Rot: Silikananopartikel.

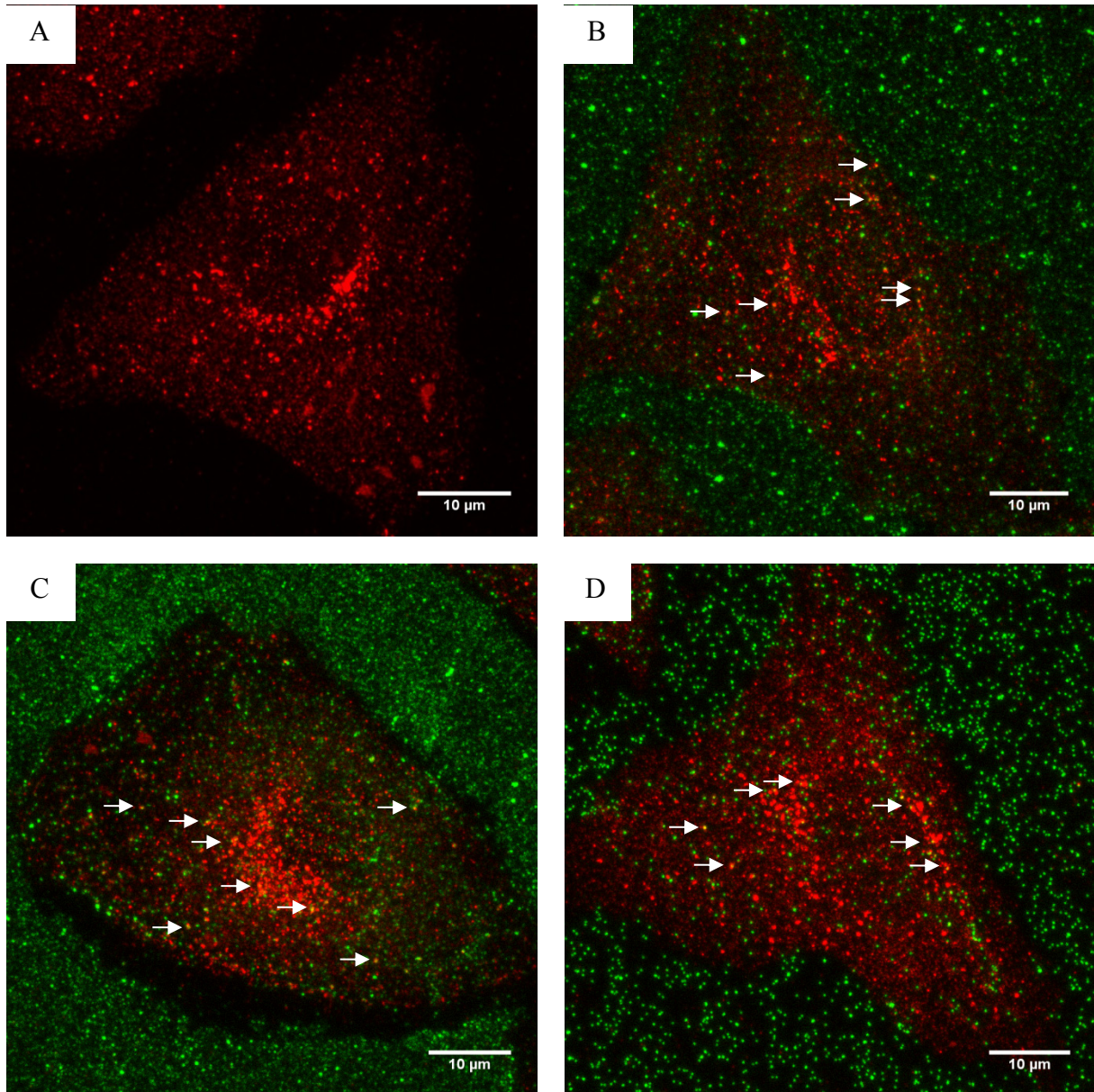
**A1:** Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ) + Si15; **A2:** Chlorpromazin + Si15; **A3:** Chlorpromazin/Filipin + Si15; **A4:** Filipin + Si15;  
**B1:** Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ) + Si25; **B2:** Chlorpromazin + Si25; **B3:** Chlorpromazin/Filipin + Si25; **B4:** Filipin + Si25;  
**C1:** Kontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ ) + Si80; **C2:** Chlorpromazin + Si80; **C3:** Chlorpromazin/Filipin + Si80; **C4:** Filipin + Si80.

### 3.9.4 Silikananopartikel in frühen Endosomen (EEA1-Färbung)

Nach einer Clathrin-abhängiger Abschnürung von aufgenommenen Vesikeln fällt das Clathrin unmittelbar von den abgeschnürten Vesikeln ab, und es bilden sich frühe Endosomen. Diese besitzen auf ihrer Membran EEA1 (*engl.* early endosome antigene) und können z.B. durch den Antikörper anti-EEA1 (*engl.* early endosome antigene 1 antibody) nachgewiesen werden.

In diesem Experiment wurden RLE-Zellen auf Deckgläsern kultiviert und nach 30 Minuten Belastungszeit mit fluoreszenten Silikananopartikeln (ohne weitere EGF-Zugabe) gewaschen und fixiert. Nach dieser Inkubationszeit werden zwar nur vereinzelt Partikel aufgenommen, jedoch ist die Partikelmenge für eine qualitative Analyse ausreichend. Nach der Belastung erfolgte eine Färbung der frühen Endosomen mit dem EEA1-Antikörper. Die Proben wurden auf Objektträgern eingebettet und am konfokalen Laser-Rastermikroskop untersucht. Mit der Software ImageJ wurde aus jedem aufgenommenen Bilderstapel Maximum-Intensitäts-Projektionen erstellt. Im Anhang werden die Einzelbilder der Bilderstapel in dem Kapitel 6.4 dargestellt.

Ein Großteil der Silikapartikel befand sich auf der Oberfläche der Zellen, während nur ein kleiner Teil der Partikel in frühen Endosomen vorlag (Abb. 3.18). Die gelben punktförmigen Überlagerungen des roten und des grünen Kanals, auf die die Pfeile deuten, zeigen Endosomen mit SiNP. Es waren auch Partikel neben den Zellen zu erkennen, die am Deckglas adhärten und einen dichten Rasen bildeten. Die Zellen in Abbildung A wurden nur mit H<sub>2</sub>O belastet und zeigten die Verteilung der frühen Endosomen in den RLE-Zellen. Der Zellkern war als Aussparung in den Zellen zu sehen, da Endosomen nicht in den Nukleus gelangen können und die Dichte der Endosomenfärbung so hoch war, dass eine Negativkontrastierung des Zellkerns erfolgte. Sie wurden in die Nähe des Zellkerns transportiert und reicherten sich um den Zellkern an. Bei der Auswertung der Abbildungen wurden Partikel in Endosomen sowohl in der Nähe der Membran gefunden als auch in der Nähe des Zellkerns. Das lässt darauf schließen, dass dieser Teil der Silikapartikel sehr schnell von den Zellen internalisiert wurde. Nicht mit der EEA1-Färbung kolocalisierende Partikel befinden sich auf der Zelloberfläche und wurden während der Belastungszeit nicht aufgenommen.



**Abbildung 3.18: Silikananopartikel in frühen Endosomen.** RLE-Zellen wurden für 30 min mit 33 µg/ml SiNP belastet. Die repräsentativen Abbildungen sind Maximum-Intensitäts-Projektionen von Bilderstapeln. Grün: Silikananopartikel; Rot: Frühe Endosomen (EEA1-Antikörper).

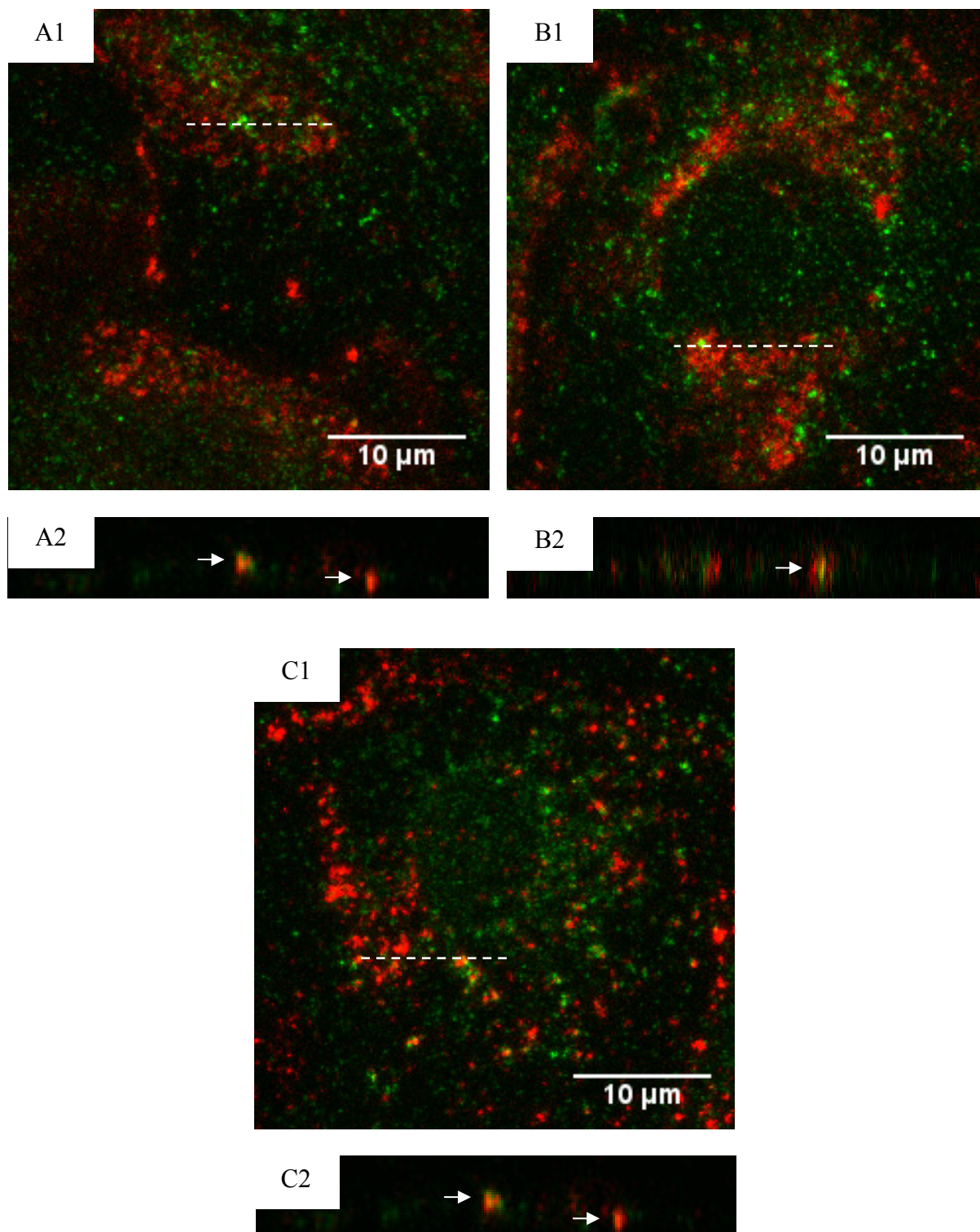
**A:** Kontrolle (H<sub>2</sub>O); **B:** Si15; **C:** Si25; **D:** Si80

### 3.9.5 Silikananopartikel in späten Endosomen (Rab7-Färbung)

Frühe endosomale Vesikel, die über Clathrin vermittelt aufgenommen wurden, werden erst zu späten Endosomen und fusionieren schließlich mit dem lysosomalen Kompartiment. Die späten Endosomen präsentieren das spezifische Protein Rab7a (*engl.* Ras-related proteins; Feng, 1995), das durch einen Antikörper (Rab7 (D95F2) XP(R) Rabbit mAb, Cell Signaling) in diesem Versuch nachgewiesen wurde.

In einem Vorversuch wurden Rab7-Färbungen nach 5, 30, 60 und 90 min Inkubation mit Silikapartikel angefertigt, um einen Zeitpunkt zu identifizieren, bei dem die Partikel in späten Endosomen lokalisierten (Anhang; Abb. 6.5). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Triplikate der Rab7-Färbung nach einer Stunde Partikelbelastung erstellt. Mit Serum-reduziertem Medium kultivierte Zellen wurden für 60 min mit SiNP belastet, fixiert und späte Endosomen gefärbt. Von den Präparaten wurden Bilderstapel aufgenommen und mit ImageJ zu Maximum-Intensitäts-Projektionen bzw. orthogonalen Darstellungen (XZ-Ausrichtung) umgeformt (Abb.3.19).

Es konnten Silikananopartikel aller drei Größen (Si15, Si25, Si80) detektiert werden, die mit Rab7-gefärbten Strukturen in den Zellen kolokalisieren. Das erkennt man an den gelben Bereichen, bei denen Signale des rot und des grün gefärbten Kanals ermittelt wurden. Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse wurden orthogonale Darstellungen (XZ) der Maximum-Intensitäts-Projektionen (XY) der Zellen erstellt. Die weißen Linien in den Übersichten (A1, B1, C1) markieren die Stellen, an denen die orthogonalen Darstellungen bestimmt wurden. Die Pfeile deuten auf Stellen, an denen die beiden Kanäle überlagern und somit auch Partikel und späte Endosomen kolokalisierten (A2, B2, C2). Obwohl die Belastungszeit mit einer Stunde deutlich länger als die 5 min bei den Experimenten zur Interaktion zwischen Partikeln und EGF war, konnten nicht mehr Partikel in den Zellen detektiert werden. Trotz der wenigen Partikelsignale in den Zellen kolokalisieren ausreichend viele Partikel mit späten Endosomen, sodass eine Aussage über die Lokalisation der SiNP nach 60 min getroffen werden kann. Vereinzelt konnten auch Partikel detektiert werden, die nicht mit späten Endosomen kolokalisierten. Diese könnten sich zum Beispiel noch in frühen Endosomen befinden oder durch einen alternativen Aufnahmeweg internalisiert worden sein.



**Abbildung 3.19: Silikananopartikel in späten Endosomen.** RLE-Zellen wurden für 1 h mit 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SiNP belastet. Grün: Späte Endosomen (Rab7-Antikörper); Rot: Silikananopartikel. Die weiße Linie zeigt die Ebene an, an der die orthogonale Darstellung erstellt wurde.

**A1, A2:** Si15; **B1, B2:** Si25; **C1, C2:** Si80. **A1, A2, A3:** Bildausschnitte der Maximum-Intensitäts-Projektionen der Bilderstapel. **A2, B2, C2:** Orthogonale Darstellungen (XZ) einer Zelle

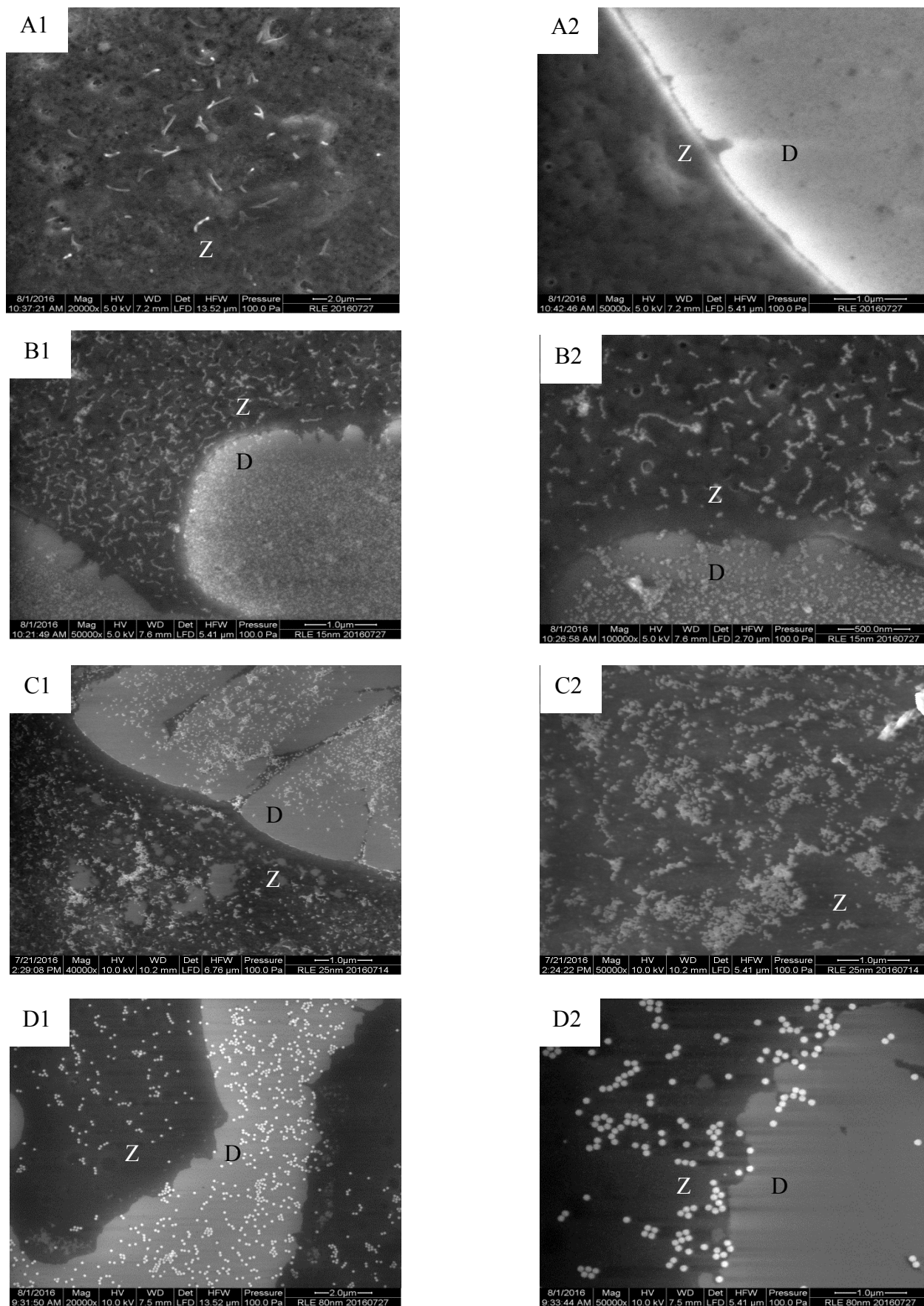
### 3.9.6 Verteilungsdichte der SiNP auf der Membran von RLE-Zellen

Mittels elektronenmikroskopischer Analysen der Zellen nach 5 min Partikelinkubation wurde untersucht, wie sich die Silikapartikel auf der äußeren Membran der Zellen anordnen und ob die Möglichkeit besteht, dass der membranständige EGFR durch eine dichte Schicht an Partikeln bedeckt wird. Mit den gewählten Abbildungsparametern dieser Methode können nur die Partikel auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden, die internalisierten Partikel wurden nicht sichtbar gemacht.

In diesem Experiment wurden RLE-Zellen auf Deckgläsern kultiviert und für 24 h mit Serum-reduziertem Medium inkubiert. Dann wurden die Zellen für 5 min mit den Silikananopartikeln belastet und fixiert. Durch Waschschrte mit aufsteigender Ethanol-Konzentration wurde den Zellen das H<sub>2</sub>O entzogen bzw. wurden die Zellen durch HMDS an der Luft getrocknet. Die Proben wurden bis zur Bildaufnahme am Elektronenmikroskop trocken gelagert.

Auf der Oberfläche von unbehandelten Zellen waren fadenförmige Zellfortsätze zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um Mikrovilli handelte (Abb. 3.20; A1). Die Oberfläche der Zellen war stark uneben und wirkte porös, was an der Präparation der Zellen liegen könnte. Die Zellen (mit Z markiert) erscheinen auf den Abbildungen im Vergleich zum Deckglas (mit D markiert) dunkler. Auffällig war, dass sich die Si15 Partikel (B1 und B2) auf der Membran der Zelle kettenförmig angeordnet hatten, während die Partikel auf dem Deckglas neben der Zelle einzeln oder in Gruppen von wenigen Partikeln zusammen lagen. Die Partikelketten bestanden aus zwei bis über dreißig einzelnen Partikeln. Dieser Befund trat nur bei den Si15 Partikeln auf; die Si25 und Si80 Partikel ordneten sich neben den Zellen und auf der Membran in gleicher Gestalt an (C1, C2, D1, D2). Es scheint so, dass die Partikelanzahl der Si80 Partikel neben den Zellen größer als auf den Zellen ist. Die Si25 Partikel hatten die Tendenz, sich zu großen Agglomeraten zusammen zu lagern, während die Si80 Partikel bis auf kleine Gruppen von zwei bis sieben Partikeln eher vereinzelt vorlagen. Dieser Befund zeigt, dass die Partikel an die Membran binden und auf diese Weise mit der Zelloberfläche interagieren. Die Menge der Partikel auf der Oberfläche der Zellen gab keinen Hinweis darauf, dass die SiNP den EGFR verdecken, weil in diesem Versuch mindestens die Hälfte der Zelloberfläche nicht mit Partikeln bedeckt war. Jedoch könnte es auch sein, dass einige Partikel, die bei der Probenpräparation womöglich gewaschen wurden, nicht detektiert wurden.





**Abbildung 3.20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von RLE-Zellen nach Belastung mit Silikananopartikeln.** RLE-Zellen wurden für 5 min mit 33 μg/ml SiNP belastet. **A1, A2:** H<sub>2</sub>O-Kontrolle; **B1, B2:** Si15; **C1, C2:** Si25; **D1, D2:** Si80. In der Abbildung: **Z:** Zellen (dunkel); **D:** Deckglas (hell).

## 4. Diskussion

Schon im Jahr 1812 wurde festgestellt, dass, durch die ubiquitäre Verteilung von natürlichem Siliziumdioxid in der Erdkruste und somit auch im Trinkwasser, Spuren von  $\text{SiO}_2$  in dem Urin von Lebewesen nachweisbar sind (Berzelius, 1812). Siliziumdioxid kann zum Beispiel auch in Form eines Nanopartikels von Lebewesen aufgenommen werden und sich dann im Körper bis zu Organen verteilen (Fu *et al.* 2013; Kettiger *et al.*, 2013). Mittlerweile konnte auch gezeigt werden, dass  $\text{SiO}_2$  Nanopartikel von humanen Zellen aufgenommen werden können (Hsiao *et al.*, 2014; Schübbe *et al.*, 2012). Diese spezifische Art der Interaktion mit lebenden Zellen kann einerseits von toxikologischer Relevanz sein; andererseits kann sie das Potential für gezielte nanotechnologische Anwendungen in den Bereichen Biotechnologie und Medizin bieten. Die fortschreitende Entwicklung der Nanotechnologie im industriellen und medizinischen Sektor ermöglicht es, Nanopartikel mit verschiedenen Eigenschaften herzustellen (Bartel *et al.*, 1996; Hartlen, 2008; Stöber, 1968). Durch Modifikationen und Funktionalisierungen von Nanopartikeln können Toxizität, Bioverfügbarkeit und Aufnahmeeffizienz verändert werden, sodass die Eigenschaften von Nanopartikeln auf ihre Anwendung abgestimmt werden können (Alkilany und Murphy, 2010; Jung *et al.*, 2011; Slowing *et al.* 2006). Es gibt Ansätze mit Silikananopartikeln, bei denen sie zum Beispiel als Transporter von Medikamenten oder siRNA eingesetzt werden (Manzano *et al.*, 2008; Meng *et al.* 2013; Slowing *et al.*, 2007 und 2008). Untersuchungen zur Toxizität von Silikananopartikeln haben ergeben, dass kolloidale SiNP im Vergleich zu kristallinen oder amorphen aber nicht kolloidalen SiNP die geringsten Entzündungsreaktionen hervorrufen (Warheit *et al.*, 1995). Das macht kolloidale Silikapartikel für eine Applikation im Menschen besonders interessant. Park *et al.* (2009) konnten beobachten, dass lumineszierende Silikananopartikel selektiv von Tumoren in Mäusen aufgenommen werden, was bedeutet, dass sich diese Nanopartikel für eine Antitumorthherapie eignen würden.

Tumoröse Entartungen epithelialer Gewebe gehen üblicherweise mit mutagenen Veränderungen des Erbguts einher. Neben selteneren Mutationen, wie zum Beispiel der KRAS-Mutation bei A549-Zellen, sind Tumore oftmals durch eine Überexpression des EGFRs gekennzeichnet (Ciardiello und Tortora, 2008). Die irreversible Aktivierung dieser proliferativen Signaltransduktion treibt maßgeblich die maligne Tumorgenese voran. Sowohl diagnostische als auch therapeutische Strategien versuchen, durch Kopplung von natürlichen Liganden an Nanopartikeln, zur Identifizierung, Lokalisierung und Behandlung von Tumorzellen im menschlichen Körper beizutragen (Jain *et al.*, 2007). Vorbefunde mit

hydrophoben Kohlenstoffnanopartikeln zeigten, dass diese auf sehr spezifische Weise mit der EGFR-abhängigen Signaltransduktion in Epithelzellen interagieren (Sydlik *et al.*, 2006; Weissenberg *et al.*, 2010). Durch die Induktion von intrazellulärem oxidativem Stress lösen diese Nanopartikel die pathogenen Endpunkte Apoptose und Proliferation aus. In der vorliegenden Arbeit wurden nun kolloidale (hydrophile) Silikananopartikel (Si15, Si25 und Si80) auf ihre Fähigkeit untersucht, mit der EGFR-abhängigen Signaltransduktion von Epithelzellen zu interagieren. Außerdem wurde der Aufnahmemechanismus der Partikel in die Zellen sowie deren Deposition in den Zellen identifiziert.

#### 4.1 Zytotoxizität

Die zytotoxische Wirkung von kolloidalem Silika wurde schon Anfang des 20. Jahrhunderts untersucht (Gye *et al.*, 1924). Mit der fortschreitenden Entwicklung der Nanotechnologie versucht man zum Beispiel durch analytische Methoden die Eigenschaften, wie die Partikelgröße zu charakterisieren oder zwischen amorphem und kristallinem Material zu unterscheiden. In mechanistischen Studien wird darüber hinaus der Kausalzusammenhang für die auftretenden Effekte von Nanopartikeln untersucht (Oberdörster *et al.*, 2005). In der Literatur wurden verschiedene Formen von Silikananopartikel-induzierter Toxizität beschrieben, die von der Struktur des Materials abhängen. Kristalline Silikapartikel verursachen *in vivo* Entzündungsreaktionen in Lungen von Mäusen, während amorphe Silikapartikel systematische Antworten des Immunsystems hervorrufen. (Lee *et al.*, 2013; Sayes *et al.*, 2007). Kolloidale amorphe Silikananopartikel lösen die geringsten toxischen Effekte in Zellen aus (Napierska *et al.*, 2010; Warheit *et al.*, 1995).

Im Zusammenhang mit der Wirkung von kolloidalen Silikananopartikeln auf Zellproliferation und Signaltransduktion wurde in dieser Arbeit zunächst eine Reihe von Untersuchungen zur Zytotoxizität durchgeführt. Da vor allem verfälschende Einflüsse auf die jeweiligen Assays ausgeschlossen werden sollten, wurden Zytotoxizitätsassays für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen bzw. Expositionsszenarien der später folgenden Experimente durchgeführt. Dabei wurde allen Experimenten die Effektdosis von flammenpyrolytisch hergestellten Partikeln [33 µg/ml] zugrunde gelegt. In keinem der angewandten Assays (Neutralrot, WST-1, Trypanblaufärbung) bzw. bei keiner der morphologischen Untersuchungen konnten nach 24 h Hinweise auf eine schädliche Wirkung der Nanopartikel beobachtet werden.

Als initialen Schritt wurde die Zytotoxizität mittels Neutralrot-Assay unter Serum-reduzierten Bedingungen untersucht (Abb. 3.1). Im Neutralrot Assay fiel auf, dass die mit SiNP behandelten Zellen einen Trend zu höheren Extinktionswerten aufwiesen, als die unbehandelten Kontrollzellen. Statistische Analysen der Mittelwerte ergaben jedoch keine Signifikanz dieses Befunds. Eine Erklärung für die höheren Werte könnte die Entstehung neuer Lysosomen sein, sodass die Gesamtmenge von Neutralrot pro Zelle erhöht wird. Eine weitere Möglichkeit könnte Partikel-induzierte Autophagie sein, die sich bei Zellen durch eine erhöhte lysosomale Aktivität äußert (Kenzaoui *et al.*, 2012). Eine Interferenz der Silikapartikel bei der Wellenlänge des Neutralrots kann ausgeschlossen werden, weil die Partikel selbst kein Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge haben (Tavernaro *et al.*, 2017). Eine solche Interaktion wurde zum Beispiel zwischen Kohlenstoffnanopartikeln und Neutralrot in einem zellfreien Versuch und an A549-Zellen gezeigt (Monteiro-Riviere *et al.*, 2009). Bei Untersuchungen mit Ceroxidnanopartikeln bzw. mit Cadmiumchlorid wurden mit vergleichbaren Dosen ebenfalls mit dem Neutralrot Assay Extinktionen oberhalb der Kontrolle festgestellt (Fotakis und Timbrell, 2006; Lanone *et al.*, 2009). Dieser Effekt wurde mit Partikel-Neutralrot Interaktionen erklärt. Die fumed Silikapartikel hatten einen leicht negativen Einfluss auf die Lysosomenintegrität und der Wert der Kohlenstoffpartikel lag etwas oberhalb des Kontrolllevels. Die Effekte beider nicht kolloidalen Partikeln waren jedoch im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Der Neutralrot Assay sagt aus, dass die kolloidalen und schwer dispergierbaren Nanopartikel in der Konzentration von 33 µg/ml keine Schädigungen der RLE-Zellen durch die Partikel ausgelöst haben.

Obwohl die meisten Inkubationszeiten der Partikel in dieser Arbeit nach wenigen Minuten bzw. Stunden beendet wurden, wurde für die Untersuchungen zur Zytotoxizität ein Belastungszeitpunkt von 24 h ausgewählt. Dies geschah, damit möglicherweise verzögerte zytotoxische Effekte der Partikel nicht übersehen werden. Die RLE-Zellen in dieser Arbeit wurden unter anderem 18 h vor der Partikelbelastung mit Medium inkubiert, das einen reduzierten Serumanteil hatte (0,5% statt 5%). Dadurch wurde die Aktivität der Zellen künstlich herabgesetzt, was dazu führen kann, dass die Zellen viel sensibler auf die Behandlung mit Partikeln reagieren als Zellen, die mit hohem Serumanteil im Medium kultiviert werden. In einem Experiment mit konfluenten, nicht Serum-reduzierten RLE-Zellen (Abb. 3.2.2) konnte mittels WST-Assay gezeigt werden, dass die Effekte der Partikel, die bei Serum-reduzierten und nicht konfluenten Bedingungen (Abb.3.2.1) auftraten, keine Relevanz mehr hatten. Ein möglicher Grund für die erhöhte Reaktivität der Partikel könnte die Interaktion der Partikel mit den Proteinen des Serums sein, was die Interaktion der Partikel

mit der Zytoplasmamembran reduziert (Peuschel *et al.*, 2015). Da auch anhand der mikroskopisch erfassten Parameter zur Bestimmung der Zytotoxizität keine Schädigung der RLE-Zellen beobachtet werden konnte, handelt es sich bei der reduzierten metabolischen Kapazität unter Serum-reduzierten Bedingungen um einen Effekt, der auf den geringen Anteil von Serumproteinen zurückzuführen ist.

In dem WST Assay wird ein Formazansalz gemessen, das NADPH-abhängig durch mitochondriale Dehydrogenasen aus dem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz (WST-1) gebildet wird. Dieser Parameter ist ein Maß für die Aktivität des Zellmetabolismus. Alle getesteten Nanopartikel hatten in diesem Versuch die metabolische Aktivität der RLE-Zellen signifikant zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle reduziert. Bei den kolloidalen SiNP gab es einen größenabhängigen Effekt, der bei den Si15 Partikeln mit über 60% am stärksten und bei den Si80 Partikeln bzw. den Kohlenstoffpartikeln mit 30% am schwächsten ausgeprägt war. Morphologische Untersuchungen während der Inkubationszeit mit den Partikeln hatten keine Veränderung der Gestalt oder der Adhärenz der Zellen gezeigt, sodass auch in diesem Experiment von keiner akuten Toxizität ausgegangen werden konnte. In anderen Studien, die sich mit kolloidalen Silikapartikeln beschäftigen, wurden mit ähnlichen Dosen und Belastungszeiten mit dem MTT-Assay auch ein Rückgang von 40 – 60% der metabolischen Aktivität bei humanen Lungenepithel-Zellen (Chang *et al.*, 2007) und murinen Makrophagen (Lee *et al.*, 2011) beobachtet. Zhu *et al.* (2013) hatten mit mesoporösen Nanopartikeln, die aus TEOS synthetisiert wurden, in dem MTT-Assay nach 48 h nur geringe Effekte der Partikel auf die Viabilität von HeLa Zellen messen können. Generell zeigen die meisten amorphen Silikapartikel eine dosisabhängige Zytotoxizität (Napierska *et al.*, 2010). Die Reduktion der metabolischen Aktivität durch die kolloidalen SiNP war etwa auf dem Niveau der schwer dispergierbaren Partikel SiF und CNP. Obwohl die SiF und CNP die enzymatische Aktivität im WST-1 Assay reduzierten, wirken sie nachweislich proliferativ auf RLE-Zellen (Sydlik *et al.*, 2006).

Schließlich wurde im Rahmen des Proliferationsassays (Kapitel 3.2) die Membranintegrität der RLE-Zellen in Vollmedium untersucht. Dabei wurden abgestorbene Zellen durch eine Trypanblaufärbung identifiziert. Die Sterberate der Zellen nach Partikelbehandlung unterschied sich jedoch nicht von unbehandelten Kontrollzellen und lag in beiden Fällen unter 2% (Trypanblau-positiv gefärbte Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl).

Die Zytotoxizität-Assays eignen sich gut, um einen Eindruck des zytotoxischen Potentials der Partikel für *in vitro* Experimente zu untersuchen. Keiner der untersuchten Parameter zeigte eine schädliche Wirkung der kolloidalen Silikananopartikel in der Konzentration 33 µg/ml, sodass die Effekte der folgenden Versuche nicht auf eine Partikel-induzierte unspezifische Zytotoxizität zurückzuführen sind.

## 4.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Neben ihrem Potential durch Oxidation von Molekülen zur Zellschädigung beizutragen, stellen reaktive Sauerstoffspezies wichtige sekundäre Botenstoffe für Signaltransduktionsereignisse dar (Sydlik *et al.*, 2006; Weissenberg *et al.*, 2010). Nanopartikel können reaktive Sauerstoffspezies extrazellulär (unabhängig von Zellen) über Reaktionen der Partikel mit Bestandteilen des Kulturmediums oder intrazellulär über Reaktionen der Partikel mit Proteinen oder enzymatischen Systemen generieren. In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffpartikel sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu einer ROS-Entstehung beitragen, indem sie, ähnlich der Fenton-Reaktion, an einer Elektronenübertragung auf Sauerstoff beteiligt sind (Aust *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 2007; Weissenberg *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde mithilfe der DCF-Assays überprüft, ob die Silikapartikel in Abwesenheit oder Anwesenheit von Zellen in der Lage sind, eine ROS-Entstehung zu induzieren. In dem zellfreien DCF-Assay wurde zu den Partikeln Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gegeben, welches als ein starkes Oxidationsmittel für Fenton (bzw. Haber-Weiss)-ähnliche Reaktion diente (Borm *et al.*, 2007). Weil eine Partikel-induzierte Entstehung von ROS oft mit einer einhergehenden zytotoxischen Wirkung in Verbindung gebracht werden (Nordberga und Arnér, 2001; Hei *et al.*, 1998), wurde aufgrund der geringen zytotoxischen Wirkung der SiNP keine ROS-Entstehung erwartet.

Sowohl mit dem zellunabhängigen als auch mit dem zellabhängigen DCF-Assay konnte eine signifikante Entstehung von ROS durch die als Positivkontrolle eingesetzten Kohlenstoffpartikel (CNP) bestätigt werden. In beiden Versuchen war die DCF-Fluoreszenz nach Belastung mit CNP vom ersten Messpunkt an erhöht und stieg über die Zeit weiter an. Die Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O sowie die SiNP (Si25 und Si80) und der SiF hatten nach 30 min nur einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität induziert, der auch durch die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid erklärt werden kann. Die Si15 Partikel hatten einen

etwas stärkeren Einfluss auf die ROS-Generierung, jedoch im Vergleich zur Kontrolle war dieser Effekt nicht signifikant. Von den kolloidalen Silikapartikeln hatten die Si15 Partikel die größte Oberfläche, was ein möglicher Grund für diesen Trend sein könnte. In dem zellabhängigen DCF-Assay wurde die intrazelluläre ROS-Entstehung nach 15 min, 1 h, 4 h und 8 h gewählt, um auch die Effekte der Partikel nach längeren Belastungszeiten zu untersuchen. Die Resultate der CNP-Belastung stimmten mit den Ergebnissen aus früheren Studien überein (Weissenberg *et al.*, 2010). Bei den kleinen SiNP sowie den SiF Partikeln machte sich nach 8 h ein größenabhängiger Trend der SiNP bemerkbar, der durch die reaktive Oberfläche erklärt werden kann, denn die Si80 Partikel hatten den geringsten Effekt. Alle Silikapartikel haben die gleichen reaktiven Moleküle an ihrer Oberfläche, und die beiden kleinen SiNP und die SiF besitzen in etwa die gleiche spezifische Oberfläche, sodass auch ein ähnliches Ergebnis dieser beiden Nanopartikel zu erwarten war. Durch die unterschiedlichen Herstellungsverfahren der Si15 und der SiF Partikel kommt es jedoch zu einer unterschiedlichen Molekülausstattung auf der Oberfläche der Partikel. Dies macht sich zum Beispiel in der unterschiedlichen Dispergierbarkeit bemerkbar, sodass die Oberfläche der Si15 Partikel hydrophiler ist, während die SiF Partikel weniger hydrophile Molekülgruppen, wie zum Beispiel OH-Gruppen, haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SiNP und SiF Partikel sowohl im zellfreien als auch im zellabhängigen DCF-Assay keine signifikante ROS-Entstehung induzieren. Lin *et al.* (2006) konnten zeigen, dass nach 48 h Inkubationszeit amorphe fumed Silikananopartikel (Degussa) mit einem Durchmesser von 15 nm, in vergleichbaren Dosen wie in dieser Arbeit, ROS bei humanen Lungenepithelzellen generieren. Park und Park (2009) hatten an murinen Makrophagen ebenfalls gezeigt, dass 12 nm große fumed Silikapartikel nach 24 h ROS induzieren, die zu Entzündungsreaktionen *in vivo* führten. Bei den in der Literatur beschriebenen Silikapartikeln, die oxidativen Stress induzieren, handelt es sich hauptsächlich um schwer dispergierbare Partikel. Einen Zusammenhang einer ROS-Entstehung und schwer dispergierbaren Nanopartikeln wurde bereits beobachtet (Schins und Knaapen, 2007). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass kolloidale Silikapartikel in einem Tierexperiment mit Mäusen ROS-induzierte DNA-Schäden verursachen (Kaewamatawong *et al.*, 2006). Diese Partikel wurden jedoch auf einem anderen Syntheseweg hergestellt und sind daher nur bedingt mit den Silikananopartikeln der vorliegenden Dissertation vergleichbar. Die in der Literatur beschriebenen ROS-induzierten Aktivierungen von EGFR-abhängigen Signalkaskaden durch schwer dispergierbare Kohlenstoffnanopartikel traten bei RLE-Zellen schon nach 5 min auf (Peuschel *et al.*, 2010 und 2012; Sydlik *et al.*, 2006; Weissenberg *et al.*, 2010; Unfried *et al.*,

2008). Hingegen wurde in dieser Arbeit nach 5 min kein messbarer Anstieg von oxidativem Stress durch kolloidale SiNP gemessen, sodass eine Interaktion der SiNP mit EGFR-vermittelter Signaltransduktion über ROS, wie für Kohlenstoffnanopartikel publiziert wurde, ausgeschlossen werden kann. In den folgenden Experimenten wurde daher untersucht, ob die Aktivierungslevels des EGFRs bzw. der nachgeschalteten Signalkinasen auf einem anderen Weg durch die Silikananopartikel beeinflusst werden.

### 4.3 Proliferation

In toxikologischen Untersuchungen stellt Zellproliferation einen zentralen Mechanismus dar, der durch Nanopartikel aktiviert oder inhibiert werden kann. Sydlik *et al.* (2006) haben beschrieben, dass schwer dispergierbare Kohlenstoffnanopartikel die Proliferation von Lungenepithelzellen induzieren. Für Goldnanopartikel hingegen wurde eine Reduktion der Zellproliferation bzw. der dafür erforderlichen EGFR-abhängigen Signalkaskaden beobachtet (Bhattacharya *et al.*, 2004 und 2007; Comfort *et al.*, 2011). Mit dem Proliferationsassay wurde in dieser Studie das Wachstumsverhalten der RLE-Zellen in Anwesenheit von den kolloidalen Silikananopartikeln untersucht.

Die mit H<sub>2</sub>O behandelten Kontrollzellen (Abb. 3.5.1) befanden sich durch die Inkubation mit Vollmedium (5% Serumanteil) nach 48 h in einer Wachstumsphase, die stärker als ein lineares Wachstum war. Das macht sich dadurch bemerkbar, dass die relative Anstieg der Zellzahl im Zeitraum 24 h bis 48 h größer als der Anstieg vom Zeitpunkt 0 h bis zum Zeitpunkt 24 h war. Im Vergleich zu einer humanen Lunge, in der die auftretenden Zelltypen ausdifferenziert sind und sie sich weniger teilen, war die Situation *in vitro* eher mit tumorartigem, sich schnell teilendem Gewebe vergleichbar. Die Si15 Partikel nehmen einen signifikanten Einfluss ( $p = 0,029$ ) auf die Zellproliferation und verhindern das exponentielle Wachstum der Zellen. Die Zellzahl der Kontrollzellen hatte sich im Vergleich zu den mit Si15 behandelten Zellen nach 48 h ungefähr verdoppelt. Die Si25 Partikel bewirken einen ähnlichen Effekt, der jedoch schwächer ausgeprägt und nicht signifikant war. Die Si80 Partikel verstärken leicht die Zellproliferation nach 48 h, jedoch wiesen diese Daten auch hohe Standardfehler auf. In dem zweiten Teil des Experiments (Abb. 3.5.2) wurden die Zellen von Beginn an zusätzlich mit EGF inkubiert, um den Zusammenhang zwischen dem Partikeleffekt und EGFR-abhängiger Signaltransduktion zu untersuchen. Schon nach 24 h konnte ein Effekt des EGFs auf die Zellzahl der nicht mit Partikeln behandelten Zellen beobachtet werden. Die Steigerung der



Zellzahl lag nach 24 h und nach 48 h bei ca. 60% im Vergleich zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle. Trotz der Anwesenheit von EGF war die Zellzahl der mit Si15 Partikeln behandelten Zellen auf demselben Niveau wie in dem Ansatz ohne EGF-Zugabe. Das bedeutet, dass die Si15 Partikel den EGF-Effekt verhindern und die über EGF-vermittelte und EGFR-abhängige Zellproliferation inhibieren. Die Si25 und Si80 Partikel reduzieren ebenfalls die EGF-abhängige Zellproliferation, jedoch nicht signifikant. Im Vergleich der drei kolloidalen SiNP wurde eine größenabhängige Ausprägung dieses Effekts beobachtet. Durch die Untersuchungen zur Zytotoxizität der SiNP konnte eine nekrotische Wirkung der Partikel ausgeschlossen werden. Mit dem folgenden Assay wurde überprüft, ob Apoptose bei der antiproliferativen Wirkung der SiNP eine Rolle spielt.

Der Apoptose/Nekrose-Assay wurde, wie der Proliferationsassay, unter nicht Serum-reduzierten Bedingungen und zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführt. An A549-Zellen, die unter vollständigem Serumentzug kultiviert wurden, konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel durch das Fehlen von Serumproteinen stärkere Reaktionen auslösen (Peuschel, 2015). Daher könnte es sein, dass die RLE-Zellen, wenn sie wie in dem WST-Assay (Kapitel 3.1.2) unter Serum-reduzierten Bedingungen kultiviert werden, sensibler auf die Nanopartikel reagieren und höhere Apoptoseraten induzieren.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass die SiNP nach 48 h unter diesen Bedingungen keine Apoptose der Zellen induzierten (Abb. 3.6.1, oben). Daher belegt dieses Experiment auch die Hypothese, dass der Effekt auf die reduzierte Zellproliferation spezifisch ist und nicht durch Zelltod erklärt werden kann. Die Anwesenheit von einem Überschuss an EGF (Abb. 3.6.1, unten) reduzierte die Sterblichkeitsrate der Kontrollzellen. Das führt dazu, dass die Apoptoserate der Zellen nach Belastung mit den kolloidalen Si25 Partikeln im Vergleich zur Kontrolle mit EGF signifikant erhöht war. Jedoch ist diese Signifikanz auf die verminderte Sterberate der EGF-Kontrolle zurückzuführen, denn die Fluoreszenzintensitäten Si25-Proben waren mit und ohne EGF-Zugabe gleich stark. Dieser Versuch zeigte außerdem, dass die fumed Silikapartikel nach 48 h eine erhöhte Sterberate der Zellen induzieren, die in etwa auf dem Niveau der Positivkontrolle (Staurosporin) lag. Die Si15 Partikel, die den stärksten Effekt auf die EGF-induzierte Zellproliferation auslösten, hatten keinen Effekt auf die Apoptose der Zellen. In einem *in vivo* Experiment von Kaewamatawong *et al.* (2006) konnte zwar in einem Mausmodell nach 3 Tagen ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate durch 14 nm große kolloidale Silikananopartikel gemessen werden, jedoch wurden Partikel

verwendet, die mit einer anderen Synthese, als die Partikel der vorliegenden Arbeit, hergestellt wurden und daher nur bedingt vergleichbar sind.

Das Ergebnis des Apoptose-/Nekrose-Assays erklärt nicht die Verminderung der Wachstumsrate in dem Proliferationsassay (Kapitel 3.2), denn die kolloidalen Si15 Partikel hatten keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose von RLE-Zellen. In dem Proliferationsassay konnte beobachtet werden, dass die Anwesenheit von Si15 Partikeln die Zellzahl nach 48 h um etwa 65% reduziert. Die Si15-induzierte Apoptoserate lag unter gleichen Versuchsbedingungen bei nur etwa 14%, was nur geringfügig mehr als die Apoptoserate der Kontrolle (11%) war. Eine zusätzliche Gabe von EGF zu Si15 Partikeln hatte keinen Einfluss auf die reduzierte Zellzahl im Proliferationsassay oder die Apoptoserate von RLE-Zellen, sodass mit diesen Versuchen eine antiproliferative Wirkung der Si15 Partikel gezeigt wurde.

Ein solcher Effekt von nicht funktionalisierten Nanopartikeln ist in der Literatur bisher einzigartig. Comfort et al. (2011) haben zwar gezeigt, dass Goldnanopartikel EGF-abhängige Signaltransduktion reduzieren, jedoch konnten keine Effekte auf die Proliferation von Zellen beobachtet werden. Mit den folgenden Versuchen wurde daher der Mechanismus des SiNP-induzierten Effekts untersucht. Die Reduzierung der Proliferation durch die Si15 und Si25 Partikel in RLE-Zellen gibt Hinweise darauf, dass eine Interaktion der Partikel mit EGF oder dem EGFR vermittelt wird, sodass die EGF-vermittelte Proliferation bzw. die Wirksamkeit von EGF inhibiert wird. In anderen Studien, bei denen die Proliferation muriner Fibroblasten (L929) bzw. humaner Epithelzellen (C11STH) auf Oberflächen untersucht wurden, die mit kolloidalen Silikananopartikeln beschichtet waren, konnte ebenfalls ein vermindertes Wachstumsverhalten der Zellen beobachtet werden, ohne dass eine Zytotoxizität detektierbar war (Cousins *et al.*, 2004; Lord *et al.*, 2006). In beiden Studien wurden an den Partikeln adsorbierte Proteine, die für die Adhäsion der Zellen eine Rolle spielen, als Ursache für die verminderte Proliferation identifiziert. Dieser Effekt verhindert laut Cousins *et al.* eine Aktivierung von Integrin-vermittelter Signaltransduktion und resultiert in einer Reduzierung des Zellwachstums. Schwer dispergierbare Carbon Black Partikel hingegen induzieren in RLE-Zellen neben einer vermehrten Proliferation auch eine gesteigerte Apoptoserate (Sydlik *et al.*, 2006). Diese beiden pathogenen Endpunkte werden durch Aktivierung von EGFR-abhängiger Signaltransduktion vermittelt. In den folgenden Experimenten wurde daher untersucht, ob die SiNP-vermittelte Reduzierung der Proliferation ebenfalls über EGFR-vermittelte Signaltransduktionswege induziert wird.

#### 4.4 EGFR-abhängige Signaltransduktion

Die EGFR-vermittelte Signaltransduktion spielt bei der Proliferation von Zellen eine zentrale Rolle. Anders als für schwer dispergierbare Kohlenstoffnanopartikel beschrieben wurde, zeigen die Versuche der vorliegenden Arbeit eine Reduzierung der EGF-abhängigen Proliferation in RLE-Zellen durch kolloidale SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel. Sydlik *et al.* (2006) hatten als Grund für das vermehrte Zellwachstum in Anwesenheit von Kohlenstoffpartikeln die Aktivierung des EGFR-vermittelten Signalweges identifiziert. Die Aktivierung des EGFRs lässt sich anhand biochemischer und zellbiologischer Schlüsselereignisse nachvollziehen. Sowohl die Aktivierung durch schwer dispergierbare Nanopartikel über ROS als auch durch natürliche Liganden wie EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  oder  $\beta$ -Cellulin führt zu einer Phosphorylierung des Rezeptors sowie zu einer anschließenden Translokation von der Membran ins Zytoplasma und ggf. zum Nukleus (Faria *et al.*, 2016; Peuschel *et al.* 2012). Die durch diese Vorgänge aktivierten Signalkaskaden nehmen Einfluss auf die Regulation von Genen, die u.a. die Proliferation von Zellen regulieren (Brand *et al.*, 2012). Die Internalisierung des membranständigen EGFR nach Aktivierung durch seine natürlichen Liganden erfolgt über Clathrin-vermittelte Endozytose und Überführung des Rezeptors in endosomale Vesikel (Madshus *et al.*, 2009). Zur Verifizierung der Spezifität der Interaktion der SiNP mit der verringerten Aktivierung des EGFR wurden beide Ereignisse der EGFR-Aktivierung, Phosphorylierung und Translokation in Anwesenheit von SiNP untersucht.

Die Phosphorylierung des EGFRs am Tyrosinrest 1173 stellt einen bedeutenden Mechanismus für die Initialisierung dieser Signalkaskade dar, der sowohl durch natürliche Liganden, wie durch hydrophobe Nanopartikel ausgelöst wird (Downward *et al.*, 1984; Peuschel *et al.* 2012). Um diesen Schritt nachzuvollziehen und die Rolle von Silikananopartikeln zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungsstatus von EGFR an Tyr1173 in Anwesenheit von SiNP nach 5 min untersucht. In Vorversuchen wurde diese Belastungszeit identifiziert, bei der Veränderungen des Phosphorylierungslevels auf der Ebene des EGFRs detektiert werden konnten. Außerdem wurden in anderen Studien mit RLE-Zellen und Kohlenstoffnanopartikeln gezeigt, dass Partikel-induzierte Signaltransduktionsereignisse nach wenigen Minuten auftreten (Peuschel *et al.* 2012; Sydlik *et al.*, 2006; Weissenberg *et al.*, 2010).

Die als Positivkontrolle verwendeten hydrophoben Kohlenstoffpartikel und die hydrophoben SiF Partikel aktivierten den EGFR nach 5 min Inkubationszeit (Abb. 3.7.1). Eine höhere Phosphorylierung durch die CNP wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Sydlik *et al.*,

2006) und entspricht dem erwarteten Ergebnis dieser Arbeit. Die Aktivierung des EGFRs nach Inkubation mit SiF lässt sich durch den Apoptose-Versuch erklären. CNP-induzierte Apoptose wird in RLE-Zellen über eine EGFR-vermittelte Aktivierung der Kinase Jnk 1/2 gesteuert (Sydlik *et al.*, 2006; Weissenberg *et al.*, 2010) und daher könnten die SiF Partikel ebenfalls EGFR-vermittelte Apoptose ausgelöst haben (Abb. 3.6.1). Die Phosphorylierungslevels des EGFRs nach Belastung mit Si80 Partikeln waren in etwa auf dem Niveau der H<sub>2</sub>O-Kontrolle, jedoch die beiden kleinen SiNP (Si15 und Si25) reduzierten die Phosphorylierung des EGFRs im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Das bedeutet, dass die Si15 und die Si25 Partikel einen negativen Effekt auf die Aktivierung des EGF-Rezeptors haben. Die Si80 Partikel hatten keinen detektierbaren Effekt auf die Phosphorylierungslevels des EGFRs. Weil das Wachstum von Zellen über eine Aktivierung des EGFRs vermittelt wird, könnte die verminderte Proliferation der RLE-Zellen in Anwesenheit von kolloidalen Si15 und Si25 Partikeln (Abb. 3.5.1/3.5.2) durch diesen Effekt erklärt werden. In den Proliferationsversuchen konnte trotz Zugabe von EGF der Partikeleffekt auf die Aktivierung des EGF-Rezeptors nicht kompensiert werden. Diese bisherigen Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die kolloidalen Silikapartikel die Proliferation und die verminderte Phosphorylierung an Tyr1173 des EGFRs entweder über eine Interaktion mit dem Rezeptor oder mit dem EGF zu einer Reduktion der Funktionsweise des EGFs vermitteln.

Ähnlich schlüssige Ergebnisse ließen sich durch die zellbiologischen Untersuchungen zur Lokalisation des Rezeptors nach der Aktivierung durch EGF beobachten (Kapitel 3.6). In diesen Versuchen wurde die Translokation des EGFR von der Zytoplasmamembran in den perinukleären Bereich der Zelle beobachtet. Durch verschiedene experimentelle Ansätzen, in denen der Ligand EGF vor den Partikeln oder nach den Partikeln zu den Zellen gegeben wurde, sollten erste Hinweise auf die Spezifität der Art der Interaktion der Nanopartikel mit den Komponenten des Signalweges gewonnen werden. In älteren Studien war bereits gezeigt worden, dass der EGFR auch bei geringerer Konzentration von 10 ng/ml EGF internalisiert wird (Watermann *et al.*, 1998) und dass die extrazelluläre Konzentration von EGF darüber entscheidet, ob der EGFR zurück zur Membran transportiert oder lysosomal degradiert wird (Polo *et al.*, 2014). Bei geringen Konzentrationen von 0,3 – 3 ng/ml EGF wird der EGFR nach seiner Internalisierung zur Membran zurück transportiert und kann erneut aktiviert werden. Bei höheren Konzentrationen von 100 ng/ml EGF wird er dagegen intrazellulär abgebaut, wodurch sich die Menge an EGFR in der Membran reduziert (Lenferink *et al.*, 1998).

Nach Behandlung mit EGF [100 ng/ml] konnte in den vorliegenden Versuchen beobachtet werden, dass der EGFR in die perinukleäre Region transloziert. Si15 und Si25 Partikel, die unmittelbar vor dem Liganden zu den Zellen gegeben werden, unterbinden diese Translokation und der EGFR verbleibt in der Membran. Weil der EGFR, bevor er internalisiert wird, zunächst einen Liganden bindet und dann dimerisiert (Yarden, 2001), ist zu vermuten, dass die Partikel die Bindung von EGF an den EGFR oder die Dimerisierung des EGFRs verhindern. Interessanterweise konnte im umgekehrten Szenario, also wenn zunächst EGF und anschließend die Nanopartikel (Si15 und Si25) appliziert wurden, kein qualitativer Einfluss der Partikel auf die Translokation des EGFRs beobachtet werden. Nach Belastung der Zellen mit den Si80 Partikeln und EGF spielte es keine Rolle, ob der EGF oder die Partikel zuerst zu den Zellen gegeben wurden, denn der EGFR translozierte in beiden Szenarien in den perinukleären Bereich. Es könnte an der geringeren spezifischen Oberfläche der Si80 Partikel liegen, dass der Effekt nur bei den beiden kleineren Partikeln auftrat.

Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Si15 und die Si25 Partikel entweder die Wirkung des Liganden EGF schwächen bzw. unterbinden, indem die Partikel EGF auf ihrer Oberfläche binden oder dass die Partikel mit dem EGFR selber interagieren und verhindern, dass EGF an den Rezeptor binden kann. Durch die folgenden Versuche sollte der Zusammenhang zwischen EGF, dem EGFR und den Partikeln geklärt werden. Die selektive Wirksamkeit der Silikananopartikel bezüglich der raschen Wirksamkeit der relativ hohen Konzentration von zugegebenem EGF weist darauf hin, dass hier eine spezifische Wirkung auf die Interaktion von Ligand und Rezeptor vorliegt. Effekte auf strukturelle Elemente der Zelle oder auf nachgeschaltete Signaltransduktionsereignisse sollten sich weniger rasch beobachtet lassen, oder keine Auswirkung auf die Translokation des Rezeptors haben. Die Spezifität der Reaktion müsste sich auch durch Auswirkungen auf dem EGFR nachgeschaltete Signalkinasen haben. Mit den folgenden Untersuchungen wurden zwei Schlüsselproteine der EGFR-vermittelten Signaltransduktion, die MAPK Erk 1/2 und die Kinase Akt, auf ihre Aktivierungslevels untersucht.

Die Aktivierung der Kinasen Erk 1/2 und Akt spielen downstream des EGFR eine Schlüsselrolle in der proliferativen Signaltransduktion. Auch für diese Signalschritte konnte bereits gezeigt werden, dass sie sowohl durch natürliche Liganden wie auch durch schwer dispergierbare Partikel auf der Ebene der Phosphorylierung aktiviert werden (Berken *et al.*, 2003; Peuschel *et al.*, 2010; Tamaoki *et al.*, 2004; Unfried *et al.*, 2008). Die Experimente der vorliegenden Arbeit haben untersucht, ob die reduzierte Phosphorylierung des EGFRs

Auswirkungen auf die Signalkinasen Erk 1/2 und Akt hat und die verminderte Proliferation der RLE-Zellen über diese Signalwege vermittelt wird. Erneut wurden diese Ereignisse durch biochemische Methoden auf der Ebene von Western Blots sowie mit zellbiologischen Methoden durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

In einem ersten Experiment wurden RLE-Zellen für 5 min mit SiNP (und CNP) belastet und dann für weitere 30 min mit frischem Medium bzw. EGF-haltigem Medium inkubiert. Die Phosphorylierungsniveaus von Erk 1/2 bzw. von Akt wurden mittels Western Blots bestimmt. Damit sollte untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe von EGF den Effekt der kolloidalen SiNP kompensieren kann. Die SiNP haben in diesem Szenario keinen signifikanten Effekt auf die Phosphorylierungsniveaus der Kinasen Erk 1/2 und Akt (3.8.1 und 3.8.3). Jedoch zeigten die Si15 Partikel die Tendenz, sowohl die EGF-abhängige Aktivierung von Erk 1/2 als auch von Akt zu reduzieren, während die Si25 und die Si80 Partikel keinen Effekt induzierten oder die EGF-abhängige Phosphorylierung sogar verstärkten. Eine Inkubation der Si15 Partikel ohne EGF-Zugabe verminderte die Aktivität von Erk 1/2 nur leicht im Vergleich zur Kontrolle, und die Aktivität von Akt wurde durch die SiNP nicht verändert.

In einem weiteren Ansatz, bei dem auch die Si15 Partikel gegen die Kohlenstoffpartikel (Positivkontrolle) verglichen wurden konnte jedoch ein deutlicher Effekt von Si15-Nanopartikeln auf die EGF-abhängige Aktivierung von Akt beobachtet werden (Abb. 3.8.5). Der Phosphorylierungslevel von Akt war in diesem Experiment nach Inkubation mit Si15 Partikeln im Vergleich zur EGF-Kontrolle sogar signifikant reduziert. Während schwer dispergierbare Kohlenstoffnanopartikel Erk 1/2 und Akt über oxidativen Stress aktivieren (Peuschel *et al.*, 2010; Sydlik *et al.*, 2006), lässt sich aus diesen Experimenten schließen, dass die Si15 Partikel auf bisher ungeklärte Weise mit EGF interagieren und die Wirksamkeit von EGF in Bezug auf eine EGFR-vermittelte Signaltransduktion über Erk 1/2 und Akt reduzieren. Das führte schließlich zur verminderten Proliferation der RLE-Zellen in Anwesenheit von Partikeln und EGF (Abb. 3.5.1 und 3.5.2).

Mit einer zweiten Methode wurde die Menge phosphorylierter Kinasen in den Zellen durch quantitative Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Präparate bestimmt (Abb. 3.9.1). Für diese Versuche wurden RLE-Zellen nach 30 minütiger Partikelinkubation für 5 min bzw. 3,5 h mit frischem Medium (0,5% FCS) bzw. EGF-haltigem Medium inkubiert und die Menge an phosphoryliertem Erk 1/2 bzw. Akt quantifiziert. Nach 5 min Belastungszeit mit EGF-haltigem bzw. Serum-reduziertem Medium konnte kein Effekt auf Erk 1/2 beobachtet werden.

3,5 h nach der Partikelinkubation konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungslevels von Erk 1/2 durch die Partikel Si15 und Si25 reduziert wurden und die EGF-vermittelte Aktivierung nicht mehr stattfand. Die Inkubation mit EGF hatte keinen Effekt auf die Partikel-induzierte Reduktion von Erk 1/2. Auch die Si80 Partikel haben nach 3,5 h einen reduzierenden Trend, der jedoch nicht als signifikant getestet wurde. Die Aktivierungslevels von Akt waren nach 30 min Belastung mit SiNP und 5 min bzw. 3,5 h Inkubation mit Serum-reduziertem Medium reduziert. Nach 5 min wurden die Phosphorylierungslevels von Akt nach Inkubation mit EGF-haltigem Medium durch die Partikel Si15 und Si80 signifikant reduziert. Dieser Effekt war nach 3,5 h noch deutlicher ausgeprägt. Die EGF-induzierte Aktivierung von Akt wurde durch alle drei Partikel signifikant reduziert.

Die Untersuchungen zur Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalkaskaden über Erk 1/2 und Akt geben Hinweise auf den Einfluss der Silikananopartikel auf diese proliferativen Ereignisse. Erk 1/2 sind sehr zentrale pleiotrope Signalmoleküle, die über eine Reihe von Signalereignissen aktiviert werden können. Neben der direkten Aktivierung über G-Proteingekoppelte Signalschritte, kann z.B. die membranabhängige Signaltransduktion über PI3Kinase und Akt zur Aktivierung dieses Signalweges beitragen (Unfried *et al.*, 2008). Diese Sensitivität für viele zelluläre Ereignisse könnte der Grund ein, weshalb sich in den Untersuchungen mit Silikananopartikeln lediglich deutliche Trends hinsichtlich der Reduktion der Phosphorylierung dieser Kinasen beobachten ließen. Ganz anders stellen sich die Effekte der Silikananopartikel auf die Phosphorylierung von Akt dar. Hier ließen sich deutliche Effekte auf die EGF-induzierte Phosphorylierung des Proteins nachweisen. Möglicherweise stellt dieser Signalweg eine spezifischere Zellantwort auf die Aktivierung mit EGFR-Liganden dar. Zusammengenommen zeigen die Untersuchungen zur Signaltransduktion, dass kolloidale Silikananopartikel spezifisch mit der ligandenabhängigen proliferativen Signaltransduktion in Epithelzellen interferieren. Dies lässt sich auf der Ebene des EGFRs anhand von Effekten auf die Phosphorylierung und die Translokation sowie auf der Ebene der nachgeschalteten Signalkinase Akt zeigen. Hierbei scheint die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor als Angriffspunkt für Silikananopartikel zu fungieren.

## 4.5 EGF-EGFR-Partikel Interaktionen

Als molekularer Mechanismus, der zu einer Störung der funktionalen Bindung zwischen Ligand und Rezeptor führen kann, wurden die physikalischen Interaktionen zwischen Nanopartikeln und den beiden Bindungspartnern EGF und EGFR untersucht. Aus der Literatur sind zahlreiche Beispiele für Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und löslichen Proteinen bekannt. So können Nanopartikel in biologischen Systemen eine Proteinkorona ausbilden, die die Eigenschaften der Partikel verändern (Tenzer *et al.*, 2013). Abhängig von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Partikel kann dabei eine Konformationsänderung der Proteine oder eine Änderung der Proteinaktivität bewirkt werden (Fenoglio *et al.*, 2011). Fei und Perret (2009) haben beschrieben, dass sich auch die enzymatische Aktivität von Proteinen durch die Bindung auf der Oberfläche von Partikeln verändert werden kann. Dabei wurden sowohl verstärkende als auch reduzierende Effekte auf die Enzymaktivität von Lysozym durch Silikananopartikel angeführt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass manche Proteine bevorzugt an Nanopartikel binden, was nicht über die Nettoladungen der Proteine bzw. der Nanopartikel erklärt werden kann (Turci *et al.*, 2010).

In einer ersten Versuchsreihe wurden die physikalischen Parameter der kolloidalen Silikapartikel in Anwesenheit von EGF in Wasser als Lösungsmittel auf der Ebene des  $\zeta$ -Potentials und des hydrodynamischen Durchmessers charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die drei kolloidalen Partikel in den verwendeten Konzentrationen ein vergleichbares negatives  $\zeta$ -Potential aufweisen, wie Partikel ohne EGF. Der Wachstumsfaktor hat demnach keinen Einfluss auf die Ladung der Partikeloberfläche. EGF hat einen isoelektrischen Punkt von  $\text{pH} = 4,6$  (Taylor *et al.*, 1972). Daher ist EGF im Zellkulturmedium bei  $\text{pH} = 7,4$  negativ geladen und eine Änderung des Ladungsvorzeichens des  $\zeta$ -Potentials der Partikel wurde nicht erwartet. Über dynamische Lichtstreuung wurde der hydrodynamische Durchmesser der Partikel in Anwesenheit von EGF bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass die SiNP in den Stammlösungen ohne EGF-Zugabe vergleichbare Durchmesser (Volumenverteilung) hatten, wie mittels TEM gemessen wurde. Für die Messung in Anwesenheit von EGF bzw. in der Konzentration  $0,066 \text{ mg/ml}$  gaben nur die Si80 verlässliche Ergebnisse, sodass die Werte der Si15 und Si25 Partikel nicht gezeigt wurden. Die Si80 Partikel hatten mit und ohne EGF im Mittel den gleichen Wert, was bedeutet, dass EGF keinen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel hatte. Dass Partikel mit Proteinen interagieren und deswegen agglomerieren können, konnte durch die Ausbildung einer Protein-Korona bewiesen werden (Drescher *et al.*, 2011). Jedoch konnte gezeigt werden, dass kolloidale Silikapartikel durch die



Anwesenheit von Serumproteinen eher stabilisiert werden (Lynch und Dawson, 2008; Yang *et al.*, 2009).

Die Versuche zur Proliferation und zur Signaltransduktion wurden mit gleichen Massekonzentrationen verschieden großer Silikananopartikel durchgeführt. Sollte tatsächlich eine physikalische Interaktion zwischen EGF und Nanopartikeln für die biologischen Effekte verantwortlich sein, so könnten Unterschiede im stöchiometrischen Verhältnis wichtige Parameter sein. Um einen Überblick über die molaren Verhältnisse zwischen den SiNP und dem EGF in den Konzentrationen der Experimente zu erhalten, wurden Berechnungen mit den Daten repräsentativer Partikelchargen durchgeführt. Es sollte abgeschätzt werden, ob die verschiedenen Partikelgrößen in der Lage sind, die vorhandene Menge an EGF auf ihrer Oberfläche zu binden. Es wurde rechnerisch ermittelt, dass die Si15 Partikel im leichten Überschuss (1,5-fach) zum EGF vorliegen, während etwa 5 x mehr EGF im Vergleich zu den Si25 Partikel in den Versuchen verwendet wird. Im Vergleich zu den Si80 Partikeln sind sogar etwa 800 x so viele EGF-Moleküle wie einzelne Partikel vorhanden. Obwohl die physikalische und chemische Natur einer Bindung des EGF an Silikananopartikel nicht bekannt ist, ergeben sich aus diesen Berechnung deutliche Unterschiede, die darauf hindeuten, dass die kleinen SiNP, bedingt durch ihre größere Oberfläche, ein deutlich höheres theoretisches Potential zur Bindung von EGF haben als die beiden größeren Silikapartikel. Diese stöchiometrischen Unterschiede könnten die Ursache sein für die in mehreren biologischen Assays beobachtete höchste Effizienz zur Hemmung der EGF Wirkung.

Diese Hypothese wurde auch in den Versuchen zur Bindung von fluoreszenzmarkiertem EGF an die SiNP (Si15 und Si80) in Wasser und in Serum-reduziertem Medium durch Ultrafiltration und Sedimentation untersucht. Bei diesen Versuchen wurden die Si15 und Si80 Partikel nicht nur mit der gleichen Massenkonzentration, wie in den Zellversuchen, eingesetzt. In zwei weiteren Ansätzen wurden die Konzentrationen der Partikel Si15 und Si80 so gewählt, dass zum einen die Si15 Partikel mit der Oberfläche der Si80 Partikel und zum anderen die Si80 Partikel mit der Oberfläche der Si80 Partikel verwendet wurden. Damit sollte überprüft werden, ob der Effekt der kleinen Partikel auf die größere spezifische Oberfläche zurückzuführen ist. Die Ergebnisse haben bestätigt, dass EGF an die Si15 Partikel bindet, denn die Menge an EGF ist nach einer Zentrifugation durch eine Membran mit dem MWCO (*engl.* molecular weight cut off) von 100 kDa im Vergleich zu nicht mit Partikeln inkubiertem EGF deutlich reduziert. Durch die Anpassung der Oberfläche der Si15 bzw. Si80 Partikel konnte die Größe der Oberfläche als Grund für die Reduzierung des EGFs

identifiziert werden. Dieses Ergebnis konnte sowohl in wässrigem Milieu als auch in Serum-reduziertem Medium bzw. unter den Versuchsbedingungen der anderen Experimente dieser Arbeit, gezeigt wurden. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, dass die Silikapartikel den EGF auf einer molekularen Ebene binden und daher die EGF-abhängige Proliferation sowie EGF-vermittelte Signaltransduktion reduziert wird. Es ist daher zu erwarten, dass die SiNP auch das sich im Medium befindende EGF binden und dessen Wirkung reduzieren. Es existiert eine Reihe von Möglichkeiten, EGF auf Oberflächen zu immobilisieren, ohne dass die Wirkungsweise des EGFs verändert wird (Cabanas-Danés *et al.*, 2014). Neben einer kovalenten Bindung von EGF kann EGF auch zum Beispiel über die His-tag Technologie gebunden werden. Bei Experimenten zum Wachstumsverhalten von neuronalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass EGF, welches über einen Chelat-Komplex gebunden wurde, sowohl seine Konformation als auch seine Funktion als EGFR-Ligand behält, während kovalent gebundenes EGF denaturiert und seine Wirkung verliert (Nakaji-Hirabayashi *et al.*, 2007 und 2008). Überträgt man diese Ergebnisse auf die Befunde der vorliegenden Dissertation, so lässt sich vermuten, dass die SiNP das EGF möglicherweise ebenfalls kovalent binden und dass der Wirkungsverlust des EGFs durch eine Konformationsänderung bzw. Denaturierung bedingt wird. Durch die Vielzahl der möglichen Interaktionen zwischen den OH-Gruppen auf der Partikeloberfläche und den Aminosäuren des Proteins sind diesbezüglich weitere Untersuchungen notwendig. In der Literatur wurde eine spezifische Bindung von EGF an die Oberfläche von Nanopartikeln mit einem einhergehenden Funktionsverlust des EGFs noch nicht beschrieben.

Die zweite Möglichkeit, bei der Silikananopartikel durch eine physikalische Interaktion der Partikel mit dem EGFR zur Hemmung der Rezeptoraktivierung führen können, wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Ähnlich wie bei therapeutischen Ansätzen, bei denen Antikörper, die gegen die Bindungsstelle des EGFRs gerichtet sind, den Rezeptor blockieren, könnten die SiNP zum Beispiel im aktiven Zentrum des EGFRs binden (Adams und Weiner, 2005). In den Analysen dieser Arbeit konnte neben der Lokalisierung des EGFR in der Zytoplasmamembran eine Verteilung des Rezeptors beobachtet werden, die an die Anordnung des Aktinskeletts erinnert (Wulf *et al.*, 1979). Ein derartiges Verteilungsmuster ist auch für A431 Zellen, eine Tumorzelllinie, die den EGFR überexprimiert, beschrieben. Auch hier wurde eine Interaktion zwischen EGFR und dem Aktinskelett beobachtet (Rijken *et al.*, 1991; Tang und Gross, 2003). Bei einer Färbung mit dem EGFR und dem Aktinskelett in RLE-Zellen (Anhang 6.3), wurde ebenfalls eine starke Kollokalisierung von Aktin und dem EGFR detektiert, bei der sich der EGFR an die Struktur des Aktinzytoskeletts anordnet. Es ist

bekannt, dass der EGFR an das Aktinskelett assoziiert ist, und mit diesem interagiert (Den Hartigh *et al.*, 1992). In den Experimenten mit den SiNP befand sich ein der größte Teil des EGFRs in der am Rand der Zellen und nur ein kleiner Teil des EGFRs befand sich innerhalb der Zellen. Es konnte jedoch keine Kollokalisierung zwischen dem EGFR und den Partikeln an der Membran oder intrazellulär gefunden werden. Das bedeutet, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen keine ausgeprägte Interaktion zwischen den Partikeln und dem EGFR in RLE-Zellen stattfindet und die Reduktion der Proliferation auf eine Interaktion zwischen den SiNP und EGF (die Menge EGF im Serum-reduzierten Medium bzw. das zusätzlich zugeführte EGF) hinweist.

Die im zellfreien Versuch nachgewiesene Interaktion von EGF und Silikananopartikeln konnte eindeutig im biologischen System mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt werden (Abb. 3.15; EGF in grün und SiNP in rot). Die Abbildungen zeigen, dass EGF mit allen drei Silikananopartikeln kollokalisiert, was auf eine Bindung des EGFs an die Partikeloberfläche der Si15 und Si25 Partikel hindeutet. Dieser Partikel-EGF-Komplex befindet sich an der Membran der Zellen oder in intrazellulären vesikelartigen Strukturen. Nachdem mit den Gelen (Kapitel 3.8) die Bindung des EGFs an die Partikel in zellfreien Versuchen gezeigt wurde, konnte dieser Effekt auch im biologischen System mit RLE-Zellen bestätigt werden. Weil eine solche Bindung von EGF an die Partikeloberfläche mit einhergehendem Funktionsverlust des Proteins, wie es zum Beispiel für Silikapartikel und Lysozym gezeigt wurde, in der Literatur nicht beschrieben wurde, handelt es sich dabei um eine einzigartige Wirkung auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion (Fei und Perret, 2009).

#### **4.6 Aufnahmemechanismus von kolloidalen SiNP in RLE-Zellen**

Die in den konfokalen Analysen beobachtete punktförmige Verteilung von Silikananopartikeln zeigt, dass diese unabhängig von ihrer Interaktion mit dem EGF von den RLE-Zellen aufgenommen werden können. Nanopartikel können über verschiedenen Mechanismen in Zellen gelangen. Dabei spielen die Dosis, die Größe und Oberflächenbeschaffenheit, die Effekte einer Proteinkorona sowie das Material der Partikel eine Rolle (Chithrani *et al.*, 2006; Treuel *et al.*, 2013). Aufgrund der unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften von Silikananopartikeln wurden in der Literatur unter anderem Caveolin- und Clathrin-abhängige Endozytose beschrieben, weshalb diese

Aufnahmewege für die Silikapartikel dieser Arbeit als wahrscheinlich erscheinen (Meng *et al.*, 2011; Slowing *et al.*, 2006). Des Weiteren beschränkt sich eine Aufnahme von Partikeln auf die den jeweiligen Zelltypen zur Verfügung stehenden Aufnahmemechanismen (Kuhn *et al.*, 2014).

Der Aufnahmemechanismus der SiNP in die RLE-Zellen wurde unter Verwendung von Inhibitoren für Clathrin-abhängige Endozytose (Chlorpromazin) und Caveolin-abhängige Endozytose (Filipin) identifiziert. Es ist bekannt, dass die Inhibitoren in höheren Dosen zytotoxisch sein können. In einem Versuch, bei dem die Zellmorphologie untersucht wurde, konnte eine ideale Konzentration ermittelt werden. Daher wurde der folgende Versuch mit der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (Chlorpromazin) bzw. 7  $\mu\text{M}$  (Filipin) durchgeführt und eine Inkubationszeit mit den Partikeln von 4 Stunden gewählt.

Um den Aufnahmemechanismus der SiNP in RLE-Zellen zu identifizieren, wurden die Zellen zunächst mit den Inhibitoren vorinkubiert und dann für 4 h mit den SiNP [33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] behandelt. Die Membran der Zellen wurde dann mit fluoreszenzgekoppeltem WGA (*engl.* wheat germ agglutine) gefärbt und orthogonale Bildansichten aus Bilderstapeln erstellt, die am konfokalen Rastermikroskop erstellt wurden. Die Auswertung der Abbildungen 3.17 hat ergeben, dass alle drei SiNP (Si15, Si25 und Si80) in Anwesenheit von Filipin von den Zellen internalisiert werden und die Menge der aufgenommenen Partikel unterschiedlich dabei nicht sichtbar von der Partikelmenge in  $\text{H}_2\text{O}$  behandelten Zellen. Daher kann Caveolin-abhängige Endozytose als Hauptaufnahmeweg der Silikananopartikel ausgeschlossen werden. Die mit Chlorpromazin bzw. Chlorpromazin und Filipin behandelten Zellen hatten keine Partikel internalisiert, sondern die SiNP kolokalisierten mit der WGA-Färbung an der äußeren Membran. Chlorpromazin verhindert die Bindung des Adaptorkomplexes AP-2 an die Membran (Wang *et al.*, 1993) und inhibiert auf diesem Weg die Bildung von CCP (*engl.* clathrin coated pits) (Yumoto *et al.*, 2006). Dieses Ergebnis bedeutet, dass die SiNP von den Zellen nicht über Caveolin-abhängige Endozytose, sondern über Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen werden. Hsiao *et al.* (2014) konnten an humanen Lungenepithel Zellen (A549) ebenfalls Clathrin-abhängige Endozytose als Hauptaufnahmeweg von 15, 60 und 200 nm großen amorphen Silikapartikeln identifizieren. Sie konnten außerdem eine dosis- und größenabhängige Aufnahmeeffizienz der Silikapartikel feststellen. Wenn der Clathrin-abhängige Endozytoseweg inhibiert wird, wurde beobachtet, dass Nanopartikel von Zellen alternativ über Makropinozytose internalisiert werden können (Meng *et al.*, 2011). Die Menge der aufgenommenen Partikel war dann sogar größer als bei nicht inhibierten Kontrollzellen

(Harush-Frenkel *et al.*, 2007). Der EGFR wird nach seiner Aktivierung mit EGF ebenfalls über Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert (Vieira *et al.*, 1996; Sigismund *et al.*, 2008). Nach der Aufnahme liegt der EGFR/EGF Komplex dann in Endosomen innerhalb von Zellen vor (Yarden, 2001). Es wurde auch herausgefunden, dass freies EGF, unabhängig vom EGFR, Clathrin-abhängig von Hela-Zellen aufgenommen wird (Conner und Schmid, 2003a). In dieser Arbeit wurde nicht der Aufnahmemechanismus der Silikananopartikel in Anwesenheit von EGF untersucht, jedoch wurde in dem Experiment zur Interaktion der SiNP mit EGF gezeigt, dass die Partikel, wenn sie den EGF auf ihrer Oberfläche gebunden haben, innerhalb der Zellen vorliegen. Eine Identifizierung dieser mit SiNP kolokalisierenden Strukturen ist Inhalt des folgenden Kapitels 4.7. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass auch der Partikel/EGF Komplex Clathrin-abhängig internalisiert wird. Ein qualitativer Vergleich der aufgenommen Partikelmengen in den verschiedenen Expositionsszenarien mit und ohne EGF zeigen keine Hinweise auf eine verbesserte oder schlechtere Aufnahme der SiNP von RLE-Zellen durch die Anwesenheit von EGF. Des Weiteren konnte kein Hinweis auf eine alternative Internalisierung der Partikel gefunden werden, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Inhibitor Chlorpromazin auch andere möglicherweise relevante Aufnahmemechanismen unterdrückt (Ivanov, 2008). Ob auch SiNP nach der Aufnahme über Exozytose wieder aus den Zellen abgegeben werden (Slowing *et al.*, 2001) oder in den Zellen verbleiben, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

#### **4.7 Lokalisation von kolloidalen SiNP in RLE-Zellen**

In einer Studie zur Aufnahme von Silikananopartikeln konnten diese in frühen endosomalen Vesikeln nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2011). Diese frühen Endosomen entwickeln sich, nachdem sich die Clathrin-Hülle um das Vesikel nach der Abschnürung an der Membran gelöst hat (Madshus und Stang, 2009). Yarden (2001) hat beschrieben, dass nach der Bildung eines CCP die Clathrinhülle binnen einer Minute von dem Vesikel abfällt und dies nach 10 min zu einem frühen Endosom gereift ist, welches sich nach weiteren 10 min zum späten Endosom entwickelt und mit einem Lysosom fusioniert. Die Zeitpunkte der folgenden Experimente wurden so gewählt, dass SiNP in den verschiedenen Endosomen detektiert werden können. Frühe Endosomen präsentieren auf ihrer Oberfläche das Protein EEA1 und können darüber identifiziert werden (Mu *et al.*, 1995; Selak *et al.*, 2004). Im Kapitel 3.10.2 wurden EEA1-positive Vesikel angefärbt, nachdem die RLE-Zellen mit SiNP belastet wurden.

Es konnte zwar in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Partikel schon nach 5 min von den RLE-Zellen internalisiert wurden, jedoch waren nach 30 min Inkubationszeit mehr Partikelsignale messbar, was für eine zeitabhängige Partikelaufnahme spricht. Alle drei SiNP konnten nach einer halben Stunde in frühen Endosomen identifiziert werden. In physiologisch gesunden Zellen formen sich die frühen Endosomen zu späten Endosomen um, die dann zu den Lysosomen transportiert werden, um mit ihnen zu fusionieren (Merésse *et al.*, 1995; Yarden *et al.*, 2001). Auf der Membran von späten Endosomen befindet sich das Protein Rab7 (Feng *et al.*, 1995), welches durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden kann. Als nächsten Schritt wurden späte Endosomen von RLE-Zellen gefärbt, nachdem die Zellen für eine Stunde mit SiNP inkubiert wurden (Kapitel 3.10.3). In der Literatur wurde gezeigt, dass sich späte Endosomen 20 – 30 min nach Beginn des Internalisierungsprozesses bilden (Yarden *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde in einem Vorversuch herausgefunden, dass nach 60 min Belastungszeit die meisten Partikel in Rab7-positiven Endosomen detektiert werden können.

Das Ergebnis dieser Lokalisations-Experimente weist darauf hin, dass die kolloidalen SiNP über frühe und späte endosomale Vesikel transportiert werden, die wahrscheinlich mit Lysosomen fusionieren. In der Literatur ist es bisher unklar, ob kolloidale Silikananopartikel in Lysosomen verbleiben, um dort in der sauren Umgebung biologisch degradiert zu werden (Cauda *et al.*, 2010; He *et al.*, 2010) oder exozytotisch aus den Zellen abgegeben werden (Slowing *et al.*, 2011). Ein EGF/Partikel Komplex würde vermutlich ebenfalls in frühen und späten Endosomen aufgenommen werden. Es wurde gezeigt, dass EGF bzw. der über EGF aktivierte EGFR ebenfalls über Clathrin internalisiert und in Endosomen deponiert werden (Haigler *et al.*, 1980; Yarden, 2001). Zeitlich gesehen findet die Internalisierung von EGF und von Partikeln synchron binnen der ersten Minuten statt. Eine alternative Aufnahme/Deponierung von einem EGF/Partikel Komplex, wie zum Beispiel über Caveolin bei der ROS-abhängigen Aktivierung des EGFRs, ist nicht zu erwarten (Zwick *et al.*, 1999).

#### **4.8 Verteilungsdichte der SiNP auf der Membran von RLE-Zellen**

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde die Anordnung der Silikananopartikel nach 5 min Inkubationszeit auf der Membran der RLE-Zellen untersucht. Es ist für diese Art von SiNP ist aus *in vitro* Experimenten bekannt, dass nach 5 h Belastungszeit etwa ein Viertel der Partikel sedimentieren und es wurde beobachtet, diese Partikel unter Serum-freien

Bedingungen durch die präparativen Schritte nicht abgewaschen werden (Peuschel *et al.*, 2015). Mit diesem Versuch soll überprüft werden, ob die SiNP einen mehrschichtigen Rasen auf der Oberfläche der Zellen bilden und den EGFR vor dem EGF-haltigen Medium abschirmen. Bei den Kontrollzellen waren auf deren Oberfläche Zellfortsätze zu erkennen, die an Mikrovilli-artige Strukturen erinnern und womöglich durch die Kulturbedingungen induziert werden (Emerman und Pitelka, 1977). Im alveolären Bereich von Rattenlungen existieren neben Pneumozyten des Typs I und II auch Bürstenzellen (*engl.* alveolar brush cells), die echte Mikrovilli auf ihrer Oberfläche besitzen. Auch alveoläre Typ II Zellen, zu denen auch die RLE-Zelllinie gehört, haben auf ihrer Oberfläche Ausstülpungen, die jedoch kleiner als Mikrovilli sind und andere Funktionen haben (Meyrick und Reid, 1968). Im Vergleich zu dem Deckglas, auf dem die Zellen kultiviert wurden, erscheinen die Zellen dunkler und besitzen eine poröse Oberfläche. Wie schon anhand der fluoreszent gefärbten Aufnahmen aus den vorherigen Versuchen beobachtet wurde, binden die Partikel sowohl an der Membran der Zellen, als auch auf dem Deckglas neben den Zellen. Das liegt an der Interaktion der Silanol-Gruppen auf der Oberfläche von den Silikapartikeln und von dem Deckglas bzw. der Interaktion zwischen den Partikeln und Proteinen, die auf dem Deckglas gebunden wurden. Im Vergleich zwischen den Si25 und den Si80 hatten die Si25 Partikel eine größere Tendenz zu agglomerieren und lagen zum großen Teil als Cluster vor, während die Si80 Partikel in kleinen Aggregaten aus wenigen Partikeln oder vereinzelt vorlagen. Mit vergleichbaren 25 und 80 nm großen kolloidalen Silikananopartikeln wurde in Arbeiten von Peuschel *et al.* (2013 und 2015) gemessen, dass nach 5 h Partikelbelastung in Anwesenheit von Serumproteinen etwa ein Viertel bis ein Fünftel der Nanopartikel sedimentieren und die Oberfläche von A549 Zellen mit Agglomeraten bedecken. Pro Zelle wurden 100-1000 gebundene Partikel detektiert. Es konnte schon in früheren Studien belegt werden, dass kleinere Partikel, wegen der größeren Oberfläche, das höhere Potential zur Agglomeration haben (Limbach *et al.*, 2005). Überraschend war die Anordnung der Si15 Partikel auf den Zellen. Während sich die Si15 Partikel neben den Zellen, ähnlich wie die Si25 Partikel, in Clustern zusammenschließen, lagen sie auf den Zellen kettenförmig vor. Aus den Bildern ist nicht ersichtlich, ob sich die Partikel-Ketten aufgrund von Wechselwirkungen mit der Membran, interpartikulären Wechselwirkungen oder durch die Behandlung der Zellen mit HDMS nach der Fixierung gebildet haben. Die Kettenbildung der Si15 Partikel könnte auch bedeuten, dass diese indirekt, ähnlich wie der EGFR, am Aktinskelett der Zellen binden (Tang und Gross, 2003). Jedoch wurde im Kapitel 3.9.1 keine Kolokalisation der SiNP und des EGFRs, welcher an dem Aktinskelett orientiert vorlag, beobachtet. In der Literatur wurde so

ein Befund bei kolloidalen Silikananopartikeln noch nicht beschrieben, jedoch wird in der Produktbeschreibung der fumed Silikapartikel (Sigma Aldrich) angegeben, dass sich die schwer dispergierbaren 14 nm großen SiF in trockenem Zustand zu Ketten fusionieren. Aufgrund der unterschiedlich hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächenbeschaffenheit der Si15 und der SiF Partikel könnte jedoch ein jeweils anderer Mechanismus für diese Anordnung verantwortlich sein. Des Weiteren konnten in diesem Experiment keine Hinweise auf die Hypothese gefunden werden, nach welcher die SiNP einen dichten Rasen auf der Zelloberfläche bilden und dadurch den EGFR vom EGF abschirmen.

## 4.9 Ausblick

Die kolloidalen Silikananopartikel inhibieren die EGF-abhängige Proliferation in RLE-6TN Zellen über einen in der Literatur neuen molekularen Mechanismus. Anders als Kohlenstoffnanopartikel, die über ROS auf der Ebene des EGFRs Signaltransduktion initiieren, wirken die in dieser Arbeit untersuchten kolloidalen Silikananopartikel eine Ebene darüber, indem sie die Wirkung des Wachstumsfaktors EGF unterbinden und eine Aktivierung des EGFRs verhindern. Dieser Effekt konnte auf molekularer Ebene (Bindung des EGFs an die Oberfläche der Silikananopartikel) und auf zellulärer Ebene (reduzierte Proliferation) in einem Lungenepithelmodell (RLE-Zellen) gezeigt werden. Diese bisher unbeschriebenen Befunde eröffnen eine neue medizinische Perspektive, Nanopartikel als antiproliferative Medikamente ohne die Funktionalisierung oder Beladung mit einem Wirkstoff einzusetzen.

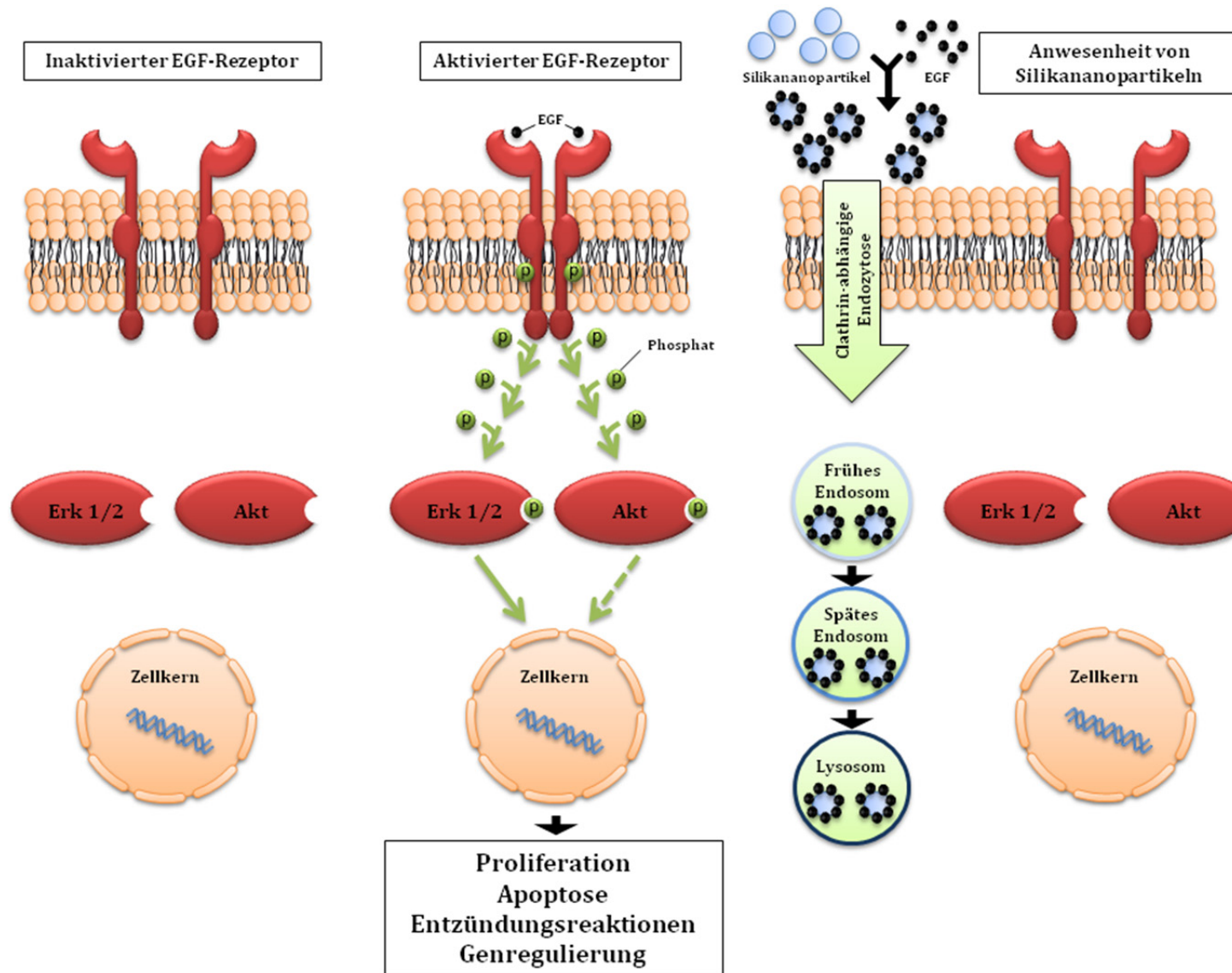
Bisherige Nanopartikel-basierte Therapieansätze beruhen u.a. auf der Funktionalisierung von Nanopartikeln mit einem Wirkstoff, wie zum Beispiel Zytostatika, der das Wachstum von Tumoren verhindern soll. Es konnte gezeigt werden, dass Zytostatika, die mit Nanopartikeln konjugiert und intravenös verabreicht wurden, selektiv von bestimmten Geweben aufgenommen werden, während sich der freie Wirkstoff in anderen Organen akkumuliert. So wurden zum Beispiel mit Doxorubicin gekoppelte Polyisohexylcyanoacrylat Nanopartikel vermehrt in Leber, Milz und Lunge, jedoch freies Doxorubicin vermehrt in Herz und Niere von Mäusen beobachtet (Verdun *et al.*, 1990). Eine ähnliche organspezifische Verteilung konnte auch mit den Zytostatika Vinblastin und Actinomycin D beobachtet werden, die mit Polymethylcyanoacrylat bzw. Polyethylcyanoacrylat Nanopartikeln gekoppelt wurden (Brasseur *et al.*, 1980; Couvrer *et al.*, 1980). Nanopartikel können auch zur Diagnose und Therapie von Tumoren verwendet werden. Dabei können zum Beispiel Nanopartikel passiv in



einem Tumor akkumulieren, indem sie dorthin über neu gebildete Gefäßsysteme (Neovaskularisation) transportiert werden (Maeda, 2001). Dieser Vorgang wird durch den sog. EPR-Effekt (*engl.* Enhanced Permeability and Retention) verstärkt, bei dem Makromoleküle bzw. Nanopartikel durch reduzierten lymphatischen Abtransport für eine längere Zeit im Tumorgewebe lokalisiert sind (Matsumura und Maeda, 1986). Des Weiteren können Nanopartikel auch aktiv zu Tumoren gesteuert werden. El-Sayed *et al.* (2006) konnten zeigen, dass mit anti-EGFR Antikörper konjugierte Goldnanopartikel bevorzugt von malignen Zellen internalisiert werden. Über diese Methode können auch zusätzlich Wirkstoffe über die Nanopartikel gezielt zu Tumoren transportiert werden. Weil der Gebrauch von der Substanzklasse der Zytostatika in der Regel mit Nebenwirkungen, wie zum Beispiel dem Fatigue-Syndrom, einhergeht, bedeutet eine Chemotherapie für Patienten oft enormen körperlichen Stress. Für die SiNP konnte eine anti-proliferative Wirkung ohne Verwendung eines Medikaments gezeigt werden, sodass die Zellproliferation von Tumoren möglicherweise ohne die Zytostatika-induzierten Nebenwirkungen reduziert werden könnte.

Besonders aufgrund ihrer geringen Zytotoxizität und deshalb guten zellulären Verträglichkeit würde sich die in dieser Arbeit verwendeten SiNP für einen Einsatz zu diagnostischen Zwecken oder zum Medikamententransport im Menschen eignen. Die RLE-Zellen sind zwar immortalisiert worden, jedoch zeigen sie keine Eigenschaften einer Tumorzelllinie (Driscoll *et al.*, 1995). Als nächsten Schritt muss gezeigt werden, dass die antiproliferative Wirkung der Si15 Partikel auch bei Tumorzellen eintritt und dass diese Wirkung spezifisch bei malignen Zellen auftritt. Viele Tumorzellen haben eine Überexpression des EGFRs (zum Beispiel die Zelllinie A431), was unter anderem zu unkontrolliertem Wachstum führt (Giard *et al.*, 1973; Paez *et al.*, 2004). Die Si15 Partikel könnten eine ungewollte Proliferation durch die EGF-bindende Wirkung reduzieren. Jedoch treten auch Zellmutationen downstream des EGFR in der Signalkaskade auf, wie zum Beispiel die kras-Mutation bei der Zelllinie A549, bei der die EGF-bindende Wirkung der kolloidalen Silikananopartikel nicht effektiv wäre (Giard *et al.*, 1973; Yoon *et al.*, 2010). Die Partikel könnten zusätzlich mit einem Wirkstoff gekoppelt werden, der weitere tumorspezifische Gewebereaktionen wie zum Beispiel Angiogenese oder Migration von Krebszellen verhindert (Nishida *et al.*, 2006; Friedl und Gilmour, 2009). Wichtig bei einer solchen Herangehensweise ist, dass die verwendeten Partikel spezifisch an Krebszellen adressiert werden bzw. die Wirksamkeit des SiNP-vermittelten Effekts an gesunden Zellen minimiert wird (Cho *et al.*, 2008). Eine weitere Möglichkeit einer Antitumorthherapie könnte die gezielte Aktivierung bzw. Inhibierung von intrazellulären Proteinen oder Genen sein. Denn durch die Clathrin-vermittelte Endozytose und die

Deponierung in endosomalen Vesikeln der Silikananopartikel könnte ein Medikament auch intrazellulär zu seinem Zielort gebracht werden. Schübbe *et al.* (2012) hatten gezeigt, dass vergleichbare Silikananopartikel mit einem Durchmesser von 32 nm sogar bis in den Nukleus transportiert werden können, sodass auch ein Transport von siRNA für die Silikapartikel in Frage kommt.



**Abbildung 4: Aufnahmemechanismus und EGFR-abhängige Signaltransduktion in Anwesenheit von Si15 Partikeln und EGF in Lungene epithelzellen. Links: Inaktivierter EGF-Rezeptor; Mitte: EGF-abhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors; Rechts: Silikananopartikel-abhängige Inaktivierung des EGF-Rezeptors durch Bindung des EGFs an der Partikeloberfläche und Aufnahmemechanismus der Silikananopartikel in RLE-Zellen.**

## 5. Literaturverzeichnis

- Abbe E., 1873, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9 (1), pp. 413-418.
- Abe M., Kuroda Y., Hirose M., Watanabe Y., Nakano M. and Handa T., 2006, Inhibition of Autophosphorylation of Epidermal Growth Factor Rezeptor by Small Peptides *in vitro*, *British Journal of Pharmacology* 147, 402-411.
- Adams G.P. and Weiner L.M., 2005, Monoclonal antibody therapy of cancer, *Nature biotechnology*, 23 (9), pp. 1147-1157.
- Akhtar M.J., Ahamed M., Kumar S., MA Majeed Khan M.M., Ahmad J. and Alrokayan S.A., 2012, Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species, *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 7, pp. 845–857.
- Ale-Agha N., Albrecht C. and Klotz L.O., 2009, Loss of gap junctional intercellular communication in rat lung epithelial cells exposed to quartz particles, *Biochemical and biophysical research communications*, 390 (1), pp. 44-47.
- Ale-Agha N, Albrecht C and Klotz L.O., 2010, Loss of gap junctional intercellular communication in rat lung epithelial cells exposed to carbon or silica-based nanoparticles. *Biol Chem.*, 391 (11), pp. 1333-1339.
- Alexiou C., Tietze R., Schreiber E., Jurgons R., Richter H., Trahms L., Rahn H., Odenbach S. and Lyer S., 2011, Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticles—magnetic drug targeting, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323 (10), pp. 1404-1407.
- Alkilany A.M. and Murphy C.J., 2010, Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?, *Journal of nanoparticle research*, 12 (7), pp. 2313-2333.
- Andjelkovic M., Alessi D.R., Meier R., Fernandez A., Lamb N.J., Frech M., Cron P., Lucocq J.M. and Hemmings B.A., 1997, Role of translocation in the activation and function of protein kinase, *B. J. Biol. Chem.* Vol. 272, pp. 31515-31524.
- Andrey L. Rogach A.L., Franzl T., Klar T.A., Feldmann J., Gaponik N., Lesnyak V., Shavel A., Eychmüller A., Rakovich Y.P. and Donegan J.F., 2007, Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art, *J. Phys. Chem. C*, 111 (40), pp. 14628–14637.
- Aranda A., Murillo R., García T., Callén M.S. and Mastral A.M., 2007, Steam activation of tyre pyrolytic carbon black: Kinetic study in a thermobalance, *Chemical Engineering Journal*, Vol. 126, Iss. 2–3, pp. 79–85.

- Aronheim A., Engelberg D., Li N., al-Alawi N, Schlessinger J. and Karin M., 1994, Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway, *Cell* 78: pp. 949-61.
- Arvizo R., Bhattacharya R. and Mukherjee P., 2010, Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine, *Expert Opin Drug Delivery*, 7, pp.753-763.
- Auffan M., Rose J., Wiesner M.R. and Bottero J.Y., 2009, Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro, *Environmental Pollution*, 157 (4), pp. 1127-1133.
- Auffan M., Rose J., Bottero J.Y., Lowry G.V., Jolivet J.P. and Wiesner M.R., 2009, Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Nature nanotechnology*, 4 (10), pp. 634-641.
- Aust S.D., Morehouse L.A. and Thomas C.E., 1985, Role of metals in oxygen radical reactions, *J Free Radic Bio. Med* 1 (1), pp. 3-25.
- Bagwe R.P., Hilliard L.R. and Tan W., 2006, Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding, *Langmuir*, 22 (9), pp. 4357-4362.
- Balasubramanian S.K., Jittiwat J., Manikandan J., Ong C.N., Yu L.E. and Ong W.-Y., 2010, Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats, *Biomaterials* 31, pp. 2034-2042.
- Barthel H., Rösch L. and Weis J., 1996, Fumed Silica-Production, Properties, and Applications, *Organosilicon Chemistry Set: From Molecules to Materials*, pp. 761-778.
- Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R., Szejda P., Seeds M.C. and Thomas M., 1983, 'Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils - A Graded Response to Membrane Stimulation', *Jour Immunol* 130, pp. 1910-1917.
- Baughman R.H., Zakhidov A.A. and de Heer W.A., 2002, Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications, *Science*, Vol. 297, Iss. 5582, pp. 787-792.
- Bell G.I., Fong N.M., Stempien M.M., Wormsted M.A., Caput D., Ku L.L., Urdea M.S., Rall L.B. and Sanchez-Pescador R., 1986, Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization, *Nucleic Acids Res* 14 (21), pp. 8427-46.
- Berken A., Abel J. and Unfried K., 2003,  $\beta$ 1-Integrin mediates asbestos-induced phosphorylation of AKT and ERK1/2 in a rat pleural mesothelial cell line, *Oncogene*, 22 (52), pp. 8524-8528.
- Berne B.J. and Pecora R., 2000, Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics, *Courier Corporation*, p. 3-4.
- Berridge M.V., Herst P.M. and Tan A.S., 2005, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnology annual review*, 11, pp. 127-152.

- Berzelius J., 1812, General views of the composition of animal fluids. *Medico-chirurgical transactions*, 3, p. 198.
- Bhattacharya R., Mukherjee P., Xiong Z., Atala A., Soker S. and Mukhopadhyay D., 2004, Gold nanoparticles inhibit VEGF165-induced proliferation of HUVEC cells *Nano Letters*, 4 (12), pp. 2479-2481.
- Bhattacharya R., Patra C.R., Verma R., Kumar S., Greipp P.R. and Mukherjee P., 2007, Gold nanoparticles inhibit the proliferation of multiple myeloma cells, *Advanced materials*, 19 (5), pp. 711-716.
- Biscardi J.S., Maa M.C., Tice D.A., Cox M.E., Leu T.H. and Parsons S.J., 1999, c-Src-mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 is Associated with Modulation of Receptor Function, *J Biol Chem*, 274, pp. 8335-8343.
- Borm P.J., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R.P.F., Stone V., Kreyling W., Lademann, J, Krutmann J., Wahrheit D. and Oberdörster E., 2006, The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC, *Particle and fibre toxicology*, 3 (1), 11.
- Borm P.J., Kelly, F., Künzli N., Schins R.P.F. and Donaldson K., 2007, Oxidant generation by particulate matter: from biologically effective dose to a promising, novel metric, *Occupational and environmental medicine*, 64 (2), pp. 73-74.
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B. and Behr, J.P., 1995, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (16), pp. 7297-7301.
- Brand T.M., Iida M., Li C. and Wheeler D.L., 2011, The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and its Role in Cancer, *Discov Med.*, 12 (66), pp. 419-432.
- Brasseur F., Couvreur P., Kante B., Deckers-Passau L., Roland M., Deckers C. and Speisers P., 1980, Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor, *European Journal of Cancer*, 16 (11), pp. 1441-1445.
- Brown, D.M., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W. and Donaldson, K., 2000, Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components, *Occupational and Environmental Medicine*, 57(10), pp. 685-691.
- Brunner T.J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R.N., Limbach L.K., Bruinink A. and Stark W.J., 2006, In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility, *Environmental science & technology*, 40 (14), pp. 4374-4381.

- Buday L. and Downward J., 1993, Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: pp. 611-20.
- Cabanas-Danés J., Huskens J. and Jonkheijm P., 2014, Chemical strategies for the presentation and delivery of growth factors, *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (17), pp. 2381-2394.
- Canelas D.A., Herlihy K.P. and DeSimone J.M., 2009, Top-down particle fabrication: control of size and shape for diagnostic imaging and drug delivery, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1 (4), pp. 391-404.
- Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G.J. and Puntès V., 2010, Time evolution of the nanoparticle protein corona, *ACS nano*, 4 (7), pp. 3623-3632.
- Cauda V., Schlossbauer A. and Bein T., 2010, Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: effect of surface functionalization with organo-silanes and poly (ethylene glycol), *Microporous and Mesoporous Materials*, 132 (1), pp. 60-71.
- Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggård T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K.A. and Linse S., 2007, Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (7), pp. 2050-2055.
- Chang J.S., Chang K.L.B., Hwang D.F. and Kong Z.L., 2007, In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line, *Environmental Science & Technology*, 41 (6), pp. 2064-2068.
- Chattopadhyay A., Vecchi M., JiQ.-S., Mernaugh R. and Carpenter G., 1999, The Role of individual SH2 Domains in Mediating Association of Phospholipase C-gamma1 with the Activated EGF Receptor, *J Biol Chem.*, 274 (37), pp. 26091-7.
- Chaves S.B., Lacava L.M., Lacava Z.G.M., Silva O., Pelegri F., Buske N., Gansau C., Morais P.C. and Azevedo R.B., 2002, Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice, *IEEE Transactions on Magnetics*, Vol. 38, Iss. 5, pp. 3231-3233.
- Chen R., Huo L., Shi X., Bai R., Zhang Z., Zhao Y., Chang Y. and Chen C., 2014, Endoplasmic reticulum stress induced by zinc oxide nanoparticles is an earlier biomarker for nanotoxicological evaluation, *ACS nano*, 8 (3), pp. 2562-2574.
- Chen X. and Mao S.S., 2007, Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications, *Chem. Rev.*, 107 (7), pp. 2891–2959.
- Chithrani B.D., Ghazani A.A. and Chan W.C., 2006, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano letters*, 6 (4), pp. 662-668.
- Cho E.C., Seo E., Kim K. and Lee S.J., 2009, Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold

- Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant, *Nano Lett.*, 9 (3), pp. 1080–1084.
- Cho K., Wang X.U., Nie S. and Shin D.M., 2008, Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clinical cancer research*, 14 (5), pp. 1310-1316.
- Cho W.S., Choi M., Han B.S., Cho M., Oh J., Park K., Kim S.J., Kim S.H. and Jeong, J., 2007, Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles, *Toxicology letters*, 175 (1), pp. 24-33.
- Chung T.H., Wu S.H., Yao M., Lu C.W., Lin Y.S., Hung Y., Mou C.Y., Chen Y.C. and Huang D.M., 2007, The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 28 (19), pp. 2959-2966.
- Ciardiello F. and Tortora G., 2008, EGFR antagonists in cancer treatment, *New England Journal of Medicine*, 358 (11), pp. 1160-1174.
- Cohen S., 1962, Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal, *J biol. Chem.*, Vol. 237, No. 6. 237:1555-1562.
- Cornacchio A.L.P. and Jones N.D., 2006, Thiolate-capped PbS nanocrystals in water: sensitivity to O<sub>2</sub>, pH and concentration, an alternate pathway for crystal growth and a top-down synthesis, *Journal of Materials Chemistry*, 16, 1171-1177.
- Comfort K.K., Maurer E.I., Braydich-Stolle L.K. and Hussain S.M., 2011, Interference of silver, gold, and iron oxide nanoparticles on epidermal growth factor signal transduction in epithelial cells, *ACS nano*, 5 (12), pp. 10000-10008.
- Conner S.D. and Schmid S.L., 2003a, Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis, *The Journal of cell biology*, 162 (5), pp. 773-780.
- Conner S.D. and Schmid S.L., 2003b, Regulated portals of entry into the cell, *Nature* Vol. 422, pp. 37-44.
- Cousins B.G., Doherty P.J., Williams R.L., Fink J. and Garvey M.J., 2004, The effect of silica nanoparticulate coatings on cellular response, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15 (4), pp. 355-359.
- Couvreur P., Kante B., Lenaerts V., Scailteur V., Roland M. and Speiser P., 1980, Tissue distribution of antitumor drugs associated with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles, *Journal of pharmaceutical sciences*, 69 (2), pp. 199-202.
- Davis C.G., 1990, The many faces of epidermal growth factor repeats, *The New Biologist* 2 (5):410-419.
- Dausend J., Musyanovych A., Dass M., Walther P., Schrezenmeier H., Landfester K. and Mailänder V., 2008, Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells, *Macromolecular Bioscience* Vol. 8, Iss. 12, pp. 1135–1143.



- de la Fuente, J.M. and Berry, C.C, 2005, Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus, *Bioconjugate chemistry*, 16 (5), pp. 1176-1180.
- Den Hartigh J.C., Van Bergen en Henegouwen P.M.P., Verkleij A.J. and Boonstra J., 1992, The EGF receptor is an actin-binding protein, *Journal of Cell Biology*, 119, pp. 349-349.
- de Palma R., Peeters S., Van Bael M.J., Van den Rul H., Bonroy K., Laureyn W., Mullens J., Borghs G. and Maes G., 2007, Silane Ligand Exchange to Make Hydrophobic Superparamagnetic Nanoparticles Water-Dispersible, *Chem. Mater.*, 2007, 19 (7), pp. 1821–1831.
- Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G.L. and Levy R.J., 1996, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Pharmaceutical research*, 13 (12), pp. 1838-1845.
- Dick C.A., Brown D.M., Donaldson K. and Stone V., 2003, The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types, *Inhalation toxicology*, 15 (1), pp. 39-52.
- Dikic I., Tokiwa G., Lev S., Courtneidge S.-A. and Schlessinger J., 1996, A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation, *Nature* 383, pp. 547 – 550.
- Donaldson K., 1999, Nonneoplastic lung responses induced in experimental animals by exposure to poorly soluble nonfibrous particles, *Inhalation toxicology*, 12 (1-2), pp. 121-139.
- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W and Stone V, 2005, Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure, *Part Fibre Toxicol*, 2, 10. 10.1186/1743-8977-2-10.
- Downward J. Parker P. and Waterfield M.D., 1984, Autophosphorylation Sites on the Epidermal Growth Factor Receptor, *Nature*, 311, pp. 483-485.
- Drescher D., Orts-Gil G., Laube G., Natte K., Veh R.W., Österle W. and Kneipp J., 2011, Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400 (5), 1367.
- Driscoll K.E., Carter J.M., Iype P.T., Kumari H.L., Crosby L.L., Aardema M.J., Isfort R.J., Cody D., Chestnut M.H., Burns J.L. and LeBoeuf L.A., 1995, Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats, *In Vitro Cell Dev Biol – Animal*, 31: p. 516.
- Duan J., Yu Y., Yu Y., Li Y., Wang J., Geng W., Jiang L., Li Q., Zhou X. and Sun Z., 2014, Silica nanoparticles induce autophagy and endothelial dysfunction via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Int J Nanomedicine.*, 4, 9, pp. 5131-5141.

- Edwards D.A., Hanes J., Caponetti G., Hrkach J., Ben-Jebria A., Eskew M.L., Mintzes J., Deaver D., Lotan N. and Langer R., 2007, Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery, *Science*, 276 (5320), pp. 1868-1872.
- Eguchi S. Shamhart P.E., Naugle J.E. and Meszaros J.G., 1999, Intracellular Signaling of Angiotensin II-induced p70 S6 Kinase Phosphorylation at Ser411 in Vascular Smooth Muscle Cells: Possible Requirement of Epidermal Growth Factor Receptor, RAS, Extracellular Signal-Regulated Kinase, and AKT, *Jour. of Biol Chem* 274, pp. 36843-36851.
- El-Sayed I.H., Huang X. and El-Sayed M.A., 2006, Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Cancer letters*, 239 (1), pp. 129-135.
- Elzey S. and Grassian V.H., 2010, Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments, *J Nanopart Res*, Vol. 12, Iss. 5, pp. 1945–1958.
- Emerman J.T. and Pitelka D.R., 1977, Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes, *In vitro*, 13 (5), pp. 316-328.
- Engel J., 1989, EGF-like domains in extracellular matrix proteins: Localized signals for growth and differentiation?, *FEBS Vol.* 251, Iss.1-2, pp. 1–7.
- European Commission, 2011, Recommendation on the definition of nanomaterial, L 275 38-40.
- Europäische Union, 2004, Industrial application of nanomaterials – chances and risks, VDI Technologiezentrum.
- Faria J.A., de Andrade C., Goes A.M., Rodrigues M.A. and Gomes, D.A., 2016, Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478 (1), pp. 39-45.
- Fei L. and Perrett S., 2009, Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis, *International journal of molecular sciences*, 10 (2), pp. 646-655.
- Feng Y., Press B. and Wandinger-Ness A., 1995, Rab 7: An important regulator of late endocytic membrane traffic, *J Cell Biol.*, 131 (6 Pt 1), pp. 1435-52.
- Fenoglio I., Fubini B., Ghibaudi E.M. and Turci F., 2011, Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces, *Advanced drug delivery reviews*, 63 (13), pp. 1186-1209.
- Filosto S., Khan E.M., Tognon E., Becker C., Ashfaq M., Ravid T. and Goldkorn T., 2011, EGF receptor exposed to oxidative stress acquires abnormal phosphorylation and aberrant activated conformation that impairs canonical dimerization, *PloS one*, 6 (8), e23240.

- Finkbeiner S. and Greenberg M.E., 1996, Ca<sup>2+</sup>-Dependent Routes to Ras: Mechanisms for Neuronal Survival, Differentiation, and Plasticity?, *Neuron* Vol. 16, Iss. 2, pp. 233–236.
- Fissan H., Neumann S., Trampe A., Pui D.Y.H. and Shin W.G., 2006, Rationale and principle of an instrument measuring lung deposited nanoparticle surface area, *Nanotechnology and Occupational Health*, pp. 53-59.
- Florence A.T., Hillery A.M., Hussain N. and Jani P.U., 1995, Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: Studies on particle uptake and fate, *Journal of Controlled Release*, Vol. 36, Iss. 1–2, pp. 39-46.
- Foley S., Crowley C., Smaih M., Bonfils C., Erlanger B.F. Seta P. and Larroque C., 2002, Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative, *Biochemical and biophysical research communications*, 294 (1), pp. 116-119.
- Fostiropoulos K., Vogel M., Mertesacker B. and Weidinger A., 2003, Preparation and investigation of phthalocyanine/C60 solar cells, *Proc. SPIE* 4801, Organic Photovoltaics III.
- Fotakis G. and Timbrell J.A., 2006, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology letters*, 160 (2), pp. 171-177.
- Frens G., 1972, Particle size and sol stability in metal colloids, *Colloid & Polymer Science*, 250, pp. 736-741.
- Frens G., 1973, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature*, Phys. Sci. 241, pp. 20-22.
- Friedl P. and Gilmour D., 2009, Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer, *Nature reviews Molecular cell biology*, 10 (7), pp. 445-457.
- Fu, C., Liu T., Li L., Liu H., Chen D. and Tang F., 2013, The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes, *Biomaterials*, 34 (10), pp. 2565-2575.
- Fubini B. and Hubbard A., 2003, Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (12), pp. 1507-1516.
- Gan Y., Shi C., Inge L., Hibner M., Balducci J. and Huang, Y., 2010, Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells, *Oncogene*, 29 (35), pp. 4947-4958.
- Gebauer J.S., Malissek M., Simon S., Knauer S.K., Maskos M., Stauber R.H., Peukert W. and Treuel L., 2012, Impact of the Nanoparticle–Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure, *Langmuir*, 28 (25), pp. 9673–9679.
- Gerloff K., Pereira D.I., Faria N., Boots A.W., Kolling J., Förster I., Albrecht C., Powell J. and Schins R.P.F., 2013, Influence of simulated gastrointestinal conditions on particle-

- induced cytotoxicity and interleukin-8 regulation in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells, *Nanotoxicology*, 7 (4), pp. 353-366.
- Ghiazza M., Polimeni M., Fenoglio I., Gazzano E., Ghigo D. and Fubini B., 2010, Does vitreous silica contradict the toxicity of the crystalline silica paradigm?, *Chem. Res. Toxicol.*, 23 (3), pp. 620-629.
- Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H. and Parks W.P., 1973, In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5), pp. 1417-1423.
- Giubellino A., 2011, GRB2 Signaling as a Molecular Target for Cancer, *Cell Signaling & Molecular Targets in Cancer*, pp 1-22.
- Goebbert C., Nonninger R., Aegerter M. and Schmidt H., 1999, Wet chemical deposition of ATO and ITO coatings using crystalline nanoparticles redispersable in solution, *Thin Solid Films*, 351 (1), pp. 79-84.
- Gojova A., Guo B., Kota R.S., Rutledge J.C., Kennedy I.M. and Barakat A.I., 2007, Induction of Inflammation in Vascular Endothelial Cells by Metal Oxide Nanoparticles: Effect of Particle Composition, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 115, No. 3, pp. 403-409.
- Gonzalez-Gaitan M., 2008, The Garden of Forking Paths: Recycling, Signaling, and Degradation, *Developmental Cell* Vol 15, Issue 2, pp 172-174.
- Graf C., Gao Q., Schütz I., Noufele C.N., Ruan W., Posselt U., Korotianskiy E., Nordmeyer D., Rancan F., Hadam S., Vogt A., Lademann J., Haucke V. and Rühl E., 2012, Surface functionalization of silica nanoparticles supports colloidal stability in physiological media and facilitates internalization in cells, *Langmuir*, 28 (20), pp. 7598-7613.
- Guo H., Qian H., Sun S., Sun D., Yin H., Cai X., Liu, Z., Wu J., Jiang T. and Liu X., 2011, Hollow mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of fluorescent dye, *Chemistry Central Journal*, 5 (1), p. 1.
- Gye W.E. and Purdy W.J., 1924, The poisonous properties of colloidal silica. III. *British journal of experimental pathology*, 5(4), 238.
- Hagemann C. and Rapp U.R., 1999, Isotype-specific functions of Raf kinases, *Exp Cell Res* 253: pp. 34-46.
- Haigler H.T., Maxfield F.R., Willingham M.C. and Pastan I., 1980, Dansylcadaverine inhibits internalization of <sup>125</sup>I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 255 (4), pp. 1239-1241.
- Hainfeld J.F., Slatkin D.N., Focella T.M. and Smilowitz H.M., 2014, Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent, *The British journal of radiology*.
- Hamilton R.F., Thakur S.A. and Holian A., 2008, Silica binding and toxicity in alveolar macrophages, *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (7), pp. 1246-1258.

- Hao X., Wu J., Shan Y., Cai M., Shang X., Jiang J. and Wang H., 2012, Caveolae-mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living Hela cells, *J Phys Condens Matter* 24, p. 164207.
- Harrison R.M. and Yin J., 2000, Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?, *Science of The Total Environment*, Vol. 249, Iss. 1–3, 17, pp. 85–101.
- Harush-Frenkel O., Debotton N., Benita S. and Altschuler Y., 2007, Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 353, Iss. 1, pp. 26–32.
- Hartlen K.D., Athanasopoulos A.P. and Kitaev V., 2008, Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to >200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays, *Langmuir* 24, pp. 1712-1720.
- He C., Wu S., Zhao N., Shi C., Liu E. and Li J., 2013, Carbon-encapsulated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a high-rate lithium ion battery anode material, *ACS nano*, 7 (5), pp 4459-4469.
- He Q., Shi J., Zhu M., Chen Y. and Chen F., 2010, The three-stage in vitro degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid, *Microporous and Mesoporous Materials*, 131 (1), pp. 314-320.
- Hei T.K. Liu S.X. and Waldren C., 1998, Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: Role of reactive oxygen species, *PNAS*, Vol. 95 no. 14, pp. 8103-8107.
- Hemmings B.A. and Restuccia D.F., 2012, PI3K-PKB/Akt Pathway, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011189.
- Henderson J., 1985, The raw materials of early glass production. *Oxford Journal of Archaeology*, 4(3), pp. 267-291.
- Hildebrandt K., Rückerl R., Koenig W., Schneider A., Pitz M., Heinrich J., Marder V., Frampton M., Oberdörster G., Wichmann H.E. and Peters A., 2009, Short-term effects of air pollution: a panel study of blood markers in patients with chronic pulmonary disease, *Particle and Fibre Toxicology* 6, p. 25.
- Hoover W.G., Hoover C.G., Kum O, Castillo V.M. Posch H.A. and Hess S., 2006, Smooth Particle Applied Mechanism, *CMST* 2 (1), pp. 65-72.
- Hsiao I.L., Gramatke A.M., Joksimovic R., Sokolowski M., Gradzielski M. and Haase A., 2014, Size and cell type dependent uptake of silica nanoparticles, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 5 (6), 1.
- Huang M., Ma Z., Khor E. and Lim L.Y., 2002, Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells, *Pharmaceutical Research* Vol. 19, Iss. 10, pp. 1488–1494.
- Huo L., Chen R., Zhao L., Shi X., Bai R., Long D., Chen F., Zhao Y., Chang Y.Z., and Chen C., 2015, Silver nanoparticles activate endoplasmic reticulum stress signaling pathway

- in cell and mouse models: the role in toxicity evaluation. *Biomaterials*, 61, pp. 307-315.
- Ivanov A I., 2008, Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?, *Exocytosis and Endocytosis*, pp. 15-33.
- Iversen T.G., Skotland T. and Sandvig, K., 2011, Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies *Nano Today*, 6 (2), pp. 176-185.
- Jäckel N., Weingarth D., Zeiger M., Aslan M., Grobelsek I. and Presser V., 2014, Comparison of carbon onions and carbon blacks as conductive additives for carbon supercapacitors in organic electrolytes, *Journal of Power Sources*, 272, pp. 1122-1133.
- Jain P.K., El-Sayed I.H., Mostafa A. and El-Sayed M.A., 2007, Au nanoparticles target cancer, *NanoToday* Vol. 2, Iss. 1, pp. 18–29.
- Jambers W., De Bock L. and Van Grieken R., 1995, Recent advances in the analysis of individual environmental particles. A review, *Analyst*, 120 (3), pp. 681-692.
- Jena P. and Castleman A.W., 2010, Nanoclusters: A Bridge Across Disciplines, *Elsevier*, p. 2.
- Jenkins B.M., Jones A.D., Turn S.Q. and Williams R.B., 1996, Particle concentrations, gas-particle partitioning, and species intercorrelations for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) emitted during biomass burning, *Atmos. Envir.*, Vol. 30, Iss. 22, pp. 3825-3835.
- Jiang, J., Oberdörster, G. and Biswas P., 2009, Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J. Nanopart. Res.*, Vol. 11, Iss. 1, pp. 11: 77.
- Jogler C., Wanner G., Kolinko S., Niebler M., Amann R., Petersen N., Kube M., Reinhardt R. and Schüler D., 2011, Conservation of proteobacterial magnetosome genes and structures in an uncultivated member of the deep-branching Nitrospira phylum, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (3), pp. 1134-1139.
- Johnston C.J., Driscoll K.E., Finkelstein J.N., Baggs R., O'Reilly M.A., Carter J., Gelein R. and Oberdörster G., 2000, Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica, *Toxicological Sciences*, 56 (2), pp. 405-413.
- Jung J.H., Lee J.H. and Shinkai S., 2011, Functionalized magnetic nanoparticles as chemosensors and adsorbents for toxic metal ions in environmental and biological fields, *Chemical Society Reviews*, 40 (9), pp. 4464-4474.
- Jung T., Kamm W., Breitenbach A., Kaiserling E., Xiao J.X. and Kissel T., 2000, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (1), pp. 147-160.

- Kaewamatawong T., Shimada A., Okajima M., Inoue H., Morita T., Inoue K. and Takano H., 2006, Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation, *Toxicologic Pathology*, 34 (7), pp. 958-965.
- Karlssona H.L., Cronholmb P., Hedbergc Y., Tornbergd M., De Batticee L., Svedheme S. and Wallinder I.O., 2013, Cell membrane damage and protein interaction induced by copper containing nanoparticles - Importance of the metal release process, *Toxicology* 313, pp. 59– 69.
- Kawasaki H., 2015, A mechanistic review of silica-induced inhalation toxicity, *Inhal Toxicol.*, 27 (8), pp. 363-377.
- Keilhack H., 1998, Phosphotyrosine 1173 Mediates Binding of the Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1 to the Epidermal Growth Factor Receptor and Attenuation of Receptor Signaling, *The Journal of biological Chemistry* Vol. 273, No. 38, pp. 24839–24846.
- Kenzaoui B.H., Bernasconi C.C., Guney-Ayra S. and Juillerat-Jeanneret L., 2012, Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells, *Biochemical Journal*, 441 (3), pp. 813-821.
- Kettiger H., Schipanski A., Wick P. and Huwyler J., 2013, Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism, *Int J Nanomedicine*, 8, pp. 3255-3269.
- Keyser T. R., Natusch D. F. S., Evans C. A., and Linton R. W., 1978, Characterizing the surfaces of environmental particles *Environ. Sci. Technol.*, 1978, 12 (7), pp. 768–773.
- Khan E. M., Heidinger J.M., Levy M., Lisanti M.P., Ravid T. and Goldkorn T., 2005, Epidermal Growth Factor Receptor Exposed to Oxidative Stress Undergoes Src- and Caveolin-1-dependent Perinuclear Trafficking, *JBC* Vol. 281, No. 20, pp. 14486–14493.
- Kikumori T., Kobayashi T., Sawaki M. and Imai T., 2009, ,Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes', *Breast Cancer Research and Treatment* Vol. 113, Iss. 3, pp. 435-441.
- Kim J.-S., Yoon T.J., Yu K.N., Noh M.S., Woo M., Kim B.G., Lee K.H., Sohn B.H., Park .B., Lee J.K. and Cho M.H., 2006, Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells, *J Vet Sci*, 7 (4), pp. 321-326.
- Kluppel M., Schröder A. and Heinrich G., 2007, Carbon Black, *Physical Properties of Polymers Handbook*, pp. 539-550.
- Kneuer C., Sameti M., Bakowsky U., Schiestel T., Schirra H., Schmidt H. and Lehr, C.M., 2000, A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro, *Bioconjugate Chemistry*, 11 (6), pp. 926-932.
- Korzeniowska B., Nooney R., Wencel D. and McDonagh C., 2013, Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing, *Nanotechnology*, 24 (44), 442002.

- Kuhn D.A., Vanhecke D., Michen B., Blank F., Gehr P., Petri-Fink A. and Rothen-Rutishauser B., 2014, Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages, *Beilstein journal of nanotechnology*, 5 (1), pp. 1625-1636.
- Kumar S., Boehm J. and Lee J.C., 2003, p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases, *Nature Reviews Drug Discovery* 2, pp. 717-726.
- Kyriakis J.M., 1999, Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological responses, *Biochemical Society Symposium*, 64: pp. 29-48.
- Laemmli U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4, *Nature* 227 (5259), pp. 680-5.
- Lai S.K., Hida, K., Man S.T., Chen C., Machamer C., Schroer T.A. and Hanes J., 2007, Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway, *Biomaterials*, 28 (18), pp. 2876-2884.
- Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix and Hoet P., 2009, Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines, *Particle and fibre toxicology*, 6 (1), p. 1.
- Lee S., Yun H.S. and Kim S.H., 2011, The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis, *Biomaterials*, 32 (35), pp. 9434-9443.
- Lee S., Kim M.S., Lee D., Kwon T.K., Khang D., Yun H.S. and Kim S.H., 2013, The comparative immunotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica nanoparticles in mice, *Int J Nanomedicine*, 8, pp. 147-158.
- Lenferink A.E.G., Pinkas-Kramarski R., van de Poll M.L.M., van Vugt M.J.H., Klapper L.N., Tzahar E., Waterman H., Sela M., van Zoelen E.J.J. and Yarden Y., 1998, Differential Endocytic Routing of Homo- and Hetero-Dimeric ErbB Tyrosine Kinases Confers Signaling Superiority to Receptor Heterodimers, *EMBO Journal* Vol. 17, No. 12, pp.3385-3397.
- Lesniak A., Campbell A., Monopoli M.P., Lynch I., Salvati A. and Dawson K.A., 2010, Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake, *Biomaterials*, 31 (36), pp. 9511-9518.
- Levkowitz G., Waterman H., Zamir E., Kam Z., Oved S., Langdon W.Y., Beguinot L., Geiger B. and Yarden Y., 1998, c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor, *Genes & Development* 12, pp. 3663-3674.
- Li Q., Rudolph V. and Peukert W., 2006, London-van der Waals adhesiveness of rough particles, *Powder Technology* 161 (3), pp. 248-255.



- Li X., Xie Q.R., Zhang J., Xia W. and Gu H., 2011, The packaging of siRNA within the mesoporous structure of silica nanoparticles *Biomaterials*, 32 (35), pp. 9546-9556.
- Lichtenberger B.M., Peter A. Gerber P.A., Holcman M., Buhren B.A., Amberg N., Smolle V., Schrumpf H., Boelke E., Ansari P., Mackenzie C., Wollenberg A., Kislak A., Fischer J.W., Röck K., Harder J., Schröder J.M., Homey B. and Sibilio M., 2013, Epidermal EGFR Controls Cutaneous Host Defense and Prevents Inflammation, *Science Translational Medicine* Vol. 5, Issue 199, pp. 199ra111.
- Limbach L.K., Li Y., Grass R.N., Brunner T.J., Hintermann M.A., Muller M., Gunther D. and Stark W.J., 2005, Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations, *Environmental science & technology*, 39 (23), pp. 9370-9376.
- Lin W., Huang Y.W., Zhou X.D. and Ma Y., 2006, In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells, *Toxicology and applied pharmacology*, 217 (3), pp. 252-259.
- Lord M.S., Cousins B.G., Doherty P.J., Whitelock J.M., Simmons A., Williams R.L. and Milthorpe B.K., 2006, The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response, *Biomaterials*, 27 (28), pp. 4856-4862.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J. and Farr A.L., Randall R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem.*, 193 (1), pp. 265-75.
- Lu L., Wang H., Zhou Y., Xi S., Zhang H., Hu J. and Zhao B., 2002, Seed-mediated growth of large, monodisperse core-shell gold-silver nanoparticles with Ag-like optical properties, *Chemical Communications*, (2), pp. 144-145.
- Lukasik S.M., Cierpicki T., Borloz M., Grembecka J., Everett A. and Bushweller J.H., 2006, High resolution structure of the HDGF PWWP domain: a potential DNA binding domain, *Protein science*, 15 (2), pp. 314-323.
- Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T. and Dawson, K.A., 2008, Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (38), pp. 14265-14270.
- Lundqvist M., Stigler J., Cedervall T., Berggård T., Flanagan M.B., Lynch I., Elia G. and Dawson K.A., 2011, The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study, *ACS nano*, 5 (9), pp. 7503-7509.
- Lunov O., Syrovets T., Loos C., Beil J., Delacher M., Tron K., Nienhaus G.U., Musyanovych A., Mailänder V., Landfester K. and Simmet T., 2011, Differential Uptake of Functionalized Polystyrene Nanoparticles by Human Macrophages and a Monocytic Cell Line, *ACS Nano*, 5 (3), pp 1657-1669.
- Lynch I. and Dawson K.A., 2008, Protein-nanoparticle interactions, *Nano today*, 3 (1), pp. 40-47.

- MacNee W. and Donaldson K., 2003, Mechanism of lung injury caused by PM<sub>10</sub> and ultrafine particles with special reference to COPD, *European Respiratory Journal* 21, pp. 47-51.
- Madshus I.H. and Stang E., 2009, Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: A model for understanding the mechanisms of receptor trafficking, *Journal of Cell Science* 122, pp. 3433-3439.
- Maeda H., 2001, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Advances in enzyme regulation*, 41 (1), pp. 189-207.
- Malvern, 2009, Intensity – Volume – Number which size is correct?, Technical note: MRK 1357-01
- Manning B.D. and Cantley L.C., 2007, AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream, *Cell* 129, pp. 1261-1274.
- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T. and Sudarsanam S., 2002, The Protein Kinase Complement of the Human Genome, *Science*, Vol. 298, Iss. 5600, pp. 1912-1934.
- Manzano M., Aina V., Arean C.O., Balas F., Cauda V., Colilla M., Delgado M.R. and Vallet-Regi M., 2008, Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization, *Chemical Engineering Journal*, 137 (1), pp. 30-37.
- Margolis B., 1990, The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma, *EMBO J.*; 9 (13), pp. 4375–4380.
- Marte B.M. and Downward J., 1997, PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond, *Trends biochem. Sciences* Vol. 22, Issue 9, pp. 355-358.
- Massague J. and Pandiella A., 1993, Membrane-Anchored Growth Factors, *Annual Review of Biochemistry* Vol. 62, pp. 515-541.
- Matsumura Y. and Maeda H., 1986, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer research*, 46 (12 Part 1), pp. 6387-6392.
- Matthew R J Carroll M.R.J., Woodward R.C., House M.J., Teoh W.Y., Amal R., Hanley T.L. and St Pierre T.G., 2009, Experimental validation of proton transverse relaxivity models for superparamagnetic nanoparticle MRI contrast agents, *Nanotechnology*, Vol. 21, p. 3.
- Medley C.D., Smith J.E., Tang Z., Wu Y., Bamrungsap S. and Tan W., 2008, Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous Cells, *Anal. Chem* 80 (4), pp. 1067–1072.

- Meier, R., Alessi D.R., Cron P., Andjelković M. and Hemmings B.A., 1997, Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase, *B. J. Biol. Chem.* Vol. 272, pp. 30491-30497.
- Meng H., Yang S., Li Z., Xia T., Chen J., Ji Z., Zhang H., Wang X., Lin S., Huang C., Zhou Z.H., Zink J.I. and Nel A.E., 2011, Aspect ratio determines the quantity of mesoporous silica nanoparticle uptake by a small GTPase-dependent macropinocytosis mechanism, *ACS nano*, 5 (6), pp. 4434-4447.
- Meng H., Mai W.X., Zhang H., Xue M., Xia T., Lin S., Wang X., Zhao Y., Ji Z., Zink J.I. and Nel A.E., 2013, Codelivery of an optimal drug/siRNA combination using mesoporous silica nanoparticles to overcome drug resistance in breast cancer in vitro and in vivo, *ACS nano*, 7 (2), pp. 994-1005.
- Méresse S., Gorvel J.P. and Chavrier P., 1995, The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes, *Journal of Cell Science*, 108 (11), pp. 3349-3358.
- Meyrick B. and Reid L., 1968, The alveolar brush cell in rat lung—a third pneumonocyte, *Journal of ultrastructure research*, 23 (1-2), pp. 71-80.
- Milani S., Baldelli Bombelli F., Pitek A.S., Dawson K.A. and Rädler J., 2012, Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona, *ACS nano*, 6 (3), pp. 2532-2541.
- Mineo C., Mineo C., Gill G.N. and Anderson R.G.W., 1999, Regulated Migration of Epidermal Growth Factor Receptor from Caveolae, *The Journal of biol. Chemistry* Vol. 274, No. 43, pp. 30636–30643.
- Mitsudomi T. and Yatabe Y., 2010, Epidermal Growth Factor Receptor in Relation to Tumor Development: EGFR Gene and Cancer, *FEBS J*, 277, pp. 301-308.
- Mohanraj V.J. and Chen Y., 2006, Nanoparticles – a review, *Trop J Pharm Res*, 5 (1), pp. 561-573.
- Monopoli M.P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I., Baldelli Bombelli F. and Dawson K.A., 2011, Physical– chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 133 (8), pp. 2525-2534.
- Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O. and Zhang L.W., 2009, Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line, *Toxicology and applied pharmacology*, 234 (2), pp. 222-235.
- Moorhead G.B., Trinkle-Mulcahy L. and Ulke-Lemée A., 2007, Emerging roles of nuclear protein Phosphatases, *Nat. Rev Mol Cell Biol*, 8 (3), pp. 234-44.
- Morrison D.K. and Cutler R.E., 1997, The complexity of Raf-1 regulation, *Curr Opin Cell Biol* 9, pp. 174-9.

- Mortensen L.J., Oberdörster G., Pentland A.P. and DeLouise L. A., 2008, In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR, *Nano letters*, 8 (9), pp. 2779-2787.
- Mortensen N.P., Hurst G.B., Wang W., Foster C.M., Nallathamby P.D. and Retterer S.T., 2013, Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity, *Nanoscale*, 5 (14), pp. 6372-6380.
- Mu F.T., Callaghan J.M., Steele-Mortimer O., Stenmark H., Parton R.G., Campbell P.L., McCluskey J., Yeo J.-P., Tock E.P.C. and Toh B.H., 1995, EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved  $\alpha$ -helical peripheral membrane protein flanked by cysteine “fingers” and contains a calmodulin-binding IQ motif, *Journal of Biological Chemistry*, 270 (22), pp. 13503-13511.
- Müller R.H., Mäder K. and Gohla S., 2000, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 50 (1), pp. 161-177.
- Mueller R., Mädler L. and Pratsinis S.E., 2003, Nanoparticle synthesis at high production rates by flame spray pyrolysis, *Chemical Engineering Science* 58, pp. 1969 – 1976.
- Nakaji-Hirabayashi T., Kato K., Arima Y. and Iwata H., 2007, Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells, *Biomaterials*, 28 (24), pp. 3517-3529.
- Nakaji-Hirabayashi T., Kato K. and Iwata H., 2008, Essential role of structural integrity and firm attachment of surface-anchored epidermal growth factor in adherent culture of neural stem cells, *Biomaterials*, 29 (33), pp. 4403-4408.
- Napierska D., Thomassen L.C., Lison D., Martens J.A. and Hoet P.H., 2010, The nanosilica hazard: another variable entity, *Particle and fibre toxicology*, 7 (1), p. 1.
- Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V. and Thompson M., 2009, Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface, *Nature materials*, 8 (7), pp. 543-557.
- Neri L.M., Borgatti P., Capitani S. and Martelli A.M., 2002, The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system, *BBA – Mol Cell Bio Lip*, Vol. 1584, Iss. 2–3, pp. 73–80.
- Nicholson R.I., Gee J.M.W. and Harper M.E., 2001, EGFR and Cancer Prognosis, *European Journal of Cancer*, Vol. 37, Supplement 4, pp. 9–15.
- Niemeyer C.M., 2001, Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science, *Angew. Chemie*, Vol. 40, Iss. 22, pp. 4128–4158.
- Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., and Kojiro M., 2006, Angiogenesis in cancer, *Vascular health and risk management*, 2 (3), pp. 213.

- Nordberga J. and Arnér E.S.J., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 31, Iss. 11, pp. 1287–1312.
- Nyati M.K., Morgan M.A., Feng F.Y. and Lawrence T. S., 2006, Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy, *Nature Reviews Cancer* 6, pp. 876-885.
- Oberdörster G., Finkelstein J.N., Johnston C., Gelein R., Cox C., Baggs R. and Elder A.C., 2000, Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice, *Research report (Health Effects Institute)*, (96), pp. 5-74.
- Oberdörster G., Stone V. and Donaldson K., 2007, Toxicology of nanoparticles: A historical perspective, *Nanotoxicology*, 1 (1), pp. 2-25.
- Oh N. and Park J.H., 2014, Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells, *Int J Nanomedicine*, 9 (Suppl 1), pp. 51-63.
- Paez J.G., Jänne P.A., Lee J.C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F.J., Lindeman N., Boggon T.J., Naoki k., Sasaki H., Fujii Y., eck M.J., Sellers W.R., Johnson B.E. and Meyerson M., 2004, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science*, 304 (5676), pp. 1497-1500.
- Pal S., Tak Y.K. and Song J.M., 2007, Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 73 no. 6, pp. 1712-1720.
- Pan Y., Leifert A., Ruau D., Neuss S., Bornemann J., Schmid G., Brandau W., Simon U. and Jahn-Dechent W., 2009, Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage, *Small Nano Micro.* Vol. 5, Iss. 18, pp. 2067–2076.
- Panessa-Warren B.J., Warren J.B., Wong S.S., and Misewich J.A., 2006, Biological cellular response to carbon nanoparticle toxicity, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18 (33), p. 2185.
- Panyam J. and Labhasetwar V., 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced drug delivery reviews*, 55 (3), pp. 329-347.
- Park E.J. and Park K., 2009, Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro, *Toxicology letters*, 184 (1), pp. 18-25.
- Park J.H., Gu L., Von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N. and Sailor M.J., 2009, Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications, *Nature materials*, 8 (4), pp. 331-336.
- Peuschel H., Sydlik U., Haendeler J., Büchner N., Stöckmann D., Kroker M., Wirth R., Brock W. and Unfried K., 2010, c-Src-mediated activation of Erk1/2 is a reaction of epithelial cells to carbon nanoparticle treatment and may be a target for a molecular preventive strategy, *Biol. Chem.*, Vol. 391, pp. 1327–1332.

- Peuschel H., Sydlik U., Grether-Beck S., Felsner I., Stöckmann D., Jakob S., Kroker M., Haendeler J., Gotić M., Bieschke C., Krutmann J. and Unfried K., 2012, Carbon nanoparticles induce ceramide- and lipid raft-dependent signalling in lung epithelial cells: a target for a preventive strategy against environmentally-induced lung inflammation, *Particle and Fibre Toxicology*, 9:48.
- Peuschel H., Ruckelshausen T., Cavelius C. and Kraegeloh A., 2013, Microscopy study on the interaction of silica nanoparticles with lung epithelial cells, *Pneumologie*, 67 (12), A10.
- Peuschel H., Ruckelshausen T., Cavelius C. and Kraegeloh A., 2015, Quantification of internalized silica nanoparticles via STED microscopy, *BioMed research international*, 2015.
- Piao M.J., Kang K.A., Lee I.K., Kim H.S., Kim S., Choi J.Y., Choi J. and Hyun J.W., 2011, Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis, *Toxicology letters*, 201 (1), pp. 92-100.
- Polo S., Di Fiore P.P. and Sigismund S., 2014, Keeping EGFR signaling in check – Ubiquitin is the guardian, *Cell Cycle* 13:5, pp. 681-682.
- Pulskamp K., Diabaté S. and Krug H.F., 2007, Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants, *Toxicology Letters*, Vol. 168, Iss. 1, pp. 58–74.
- Rao J.P. and Geckeler K.E, 2011, Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36 (7), pp. 887-913.
- Rauch J., Kolch W., Laurent S. and Mahmoudi M., 2013, Big signals from small particles: regulation of cell signaling pathways by nanoparticles, *Chemical reviews*, 113 (5), pp. 3391-3406.
- Reginato M.J., Mills K.R., Paulus J.K., Lynch D.K., Sgroi D.C., Debnath J., Muthuswamy S.K. and Brugge J.S., 2003, Integrins and EGFR Coordinately Regulate the Pro-Apoptotic Protein Bim to Prevent Anoikis, *Nature Cell Biology* 5, pp. 733 – 740.
- Rijken P.J., Hage W.J., en Henegouwen P.V.B., Verkleij A.J., & Boonstra, J., 1991, Epidermal growth factor induces rapid reorganization of the actin microfilament system in human A431 cells, *Journal of Cell Science*, 100 (3), pp. 491-499.
- Rimal B., Greenberg A.K. and Rom W.N., 2005, Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding, *Current opinion in pulmonary medicine*, 11 (2), pp. 169-173.
- Robinson D.R., Wu Y.M. and Lin S.F., 2000, The Protein tyrosin kinase family of the human genome, *Oncogene*, 19 (49), pp. 5548-57.
- Salvati A., Pitek A.S., Monopoli M.P., Prapainop K., Bombelli F B., Hristov D.R., Kelly P.M., Åberg C., Mahon E. and Dawson K.A., 2013. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface, *Nature nanotechnology*, 8 (2), pp. 137-143.

- Sambhy V. MacBride M.M., Peterson B.R. and Sen A., 2006, 'Silver Bromide Nanoparticle/Polymer Composites: Dual Action Tunable Antimicrobial Materials', *Journal of American Chemical Society*, 128 (30), pp. 9798–9808.
- Sánchez I., Hughes R.T., Mayer B.J., Yee K., Woodgett J.R., Avruch J., Kyriakis J.M. and Zon L.I., 1994, Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun, *Nature* 372, pp. 794-798.
- Sayes C.M., Reed K.L. and Warheit D.B., 2007, Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles, *Toxicological sciences*, 97 (1), pp. 163-180.
- Schins R.P.F. and Knaapen A.M., 2007, Genotoxicity of poorly soluble particles, *Inhalation toxicology*, 19 (sup1), pp. 189-198.
- Schlessinger J., 1993, How receptor tyrosine kinases activate Ras, *Trends Biochem Sci* 18, pp. 273-5.
- Schlessinger J., 1994, SH2/SH3 signaling proteins, *Curr Opin Genet Dev* 4, pp. 25-30.
- Schmidt-Ullrich R.K., Mikkelsen R.B., Dent P., Todd D.G., Valerie K., Kavanagh B.D., Contessa J.N., Rorrer W.K. and Chen P.B., 1997, Radiation-induced proliferation of human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation, *Oncogene* 15, pp 1191-1197.
- Schröder U. and Sabel B.A., 1996, 'Nanoparticles, a drug carrier system to pass the blood-brain barrier, permit central analgesic effects of i.v. dalargin injections', *Brain Research* 710, pp. 121-124.
- Schübbe S., Cavelius C., Schumann C., Koch M. and Kraegeloh A., 2010, STED Microscopy to Monitor Agglomeration of Silica Particles Inside A549 Cells, *A. Adv. Eng. Mat.*, Vol. 12, Iss. 5, pp. 417–422
- Schübbe S., Schumann C., Cavelius C., Koch M., Müller T. and Kraegeloh A., 2012, Size-Dependent Localization and Quantitative Evaluation of the Intracellular Migration of Silica Nanoparticles in Caco-2 Cells, *Chem. Mater.*, 24 (5), pp 914–923.
- Schulze C., Schaefer U. F., Ruge C. A., Wohlleben W. and Lehr C. M., 2011, Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A, *European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 77 (3), pp. 376-383.
- Schumann C., Schübbe S., Cavelius C. and Kraegeloh A., 2012, A correlative approach at characterizing nanoparticle mobility and interactions after cellular uptake, *Journal of biophotonics*, 5 (2), pp. 117-127.
- Selak S., Braun J.E. and Fritzler M.J., 2004, Characterization of early endosome antigen 1 in neural tissues, *Biochemical and biophysical research communications*, 323 (4), pp. 1334-1342.

- Shannahan J.H., Lai X., Ke P.C., Podila R., Brown J.M. and Witzmann F.A., 2013, Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media, *PLoS One*, 8 (9), e74001.
- Sharma V. Shukla R.K., Saxena N., Parmar D., Das M. and Dhawan A., 2009, DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology Letters*, Vol. 185, Iss. 3, pp. 211–218.
- Sharma V., Anderson D. and Dhawan A., 2012, Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2), *Apoptosis*, 17 (8), pp. 852-870.
- She Q.-B., Solit D.B., Ye Q., O'Reilly K.E., Lobo J. and Rosen N., 2005, The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells, *Cancer Cell*, Vol. 8, Iss. 4, pp. 287–297.
- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Bhonde R.R. and Sastry M., 2005, Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview, *Langmuir*, 2005, 21 (23), pp 10644–10654.
- Shukla R K., Sharma V., Pandey A.K., Singh S., Sultana S. and Dhawan A., 2011, ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology in Vitro*, 25 (1), pp. 231-241.
- Sigismund S., Argenzio E., Tosoni D., Cavallaro E., Polo S. and Di Fiore P.P., 2008, Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation, *Developmental Cell* 15, Iss. 2, pp. 209–219.
- Sigismund S., Algisi V., Nappo G., Conte A., Pascolutti R., Cuomo A., Bonaldi T., Argenzio E., Verhoef L.G.G.C., Maspero E., Bianchi F., Capuani F, Ciliberto A., Polo S. and Di Fiore P.P., 2013, Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate, *The EMBO journal*, 32 (15), pp. 2140-2157.
- Simpson R.J., Smith J.A., Moritz R.L., O'Hare M.J., Rudland P.S., Morrison J.R., Lloyd C.J., Grego B., Burgess A.W. and Nice E.C., 1985, Rat epidermal growth factor: complete amino acid sequence. Homology with the corresponding murine and human proteins; isolation of a form truncated at both ends with full in vitro biological activity, *Eur J Biochem.*, 153 (3), pp. 629-37.
- Singh A.B. and Harris R.C., 2005, Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands, *Cellular Signalling*, Vol. 17, Iss. 10, pp. 1183–1193.
- Singh N., Jenkins G.J., Asadi R. and Doak S.H., 2010, Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), *Nano Reviews & Experiments*, 1:5358.
- Singh S., Shi T., Duffin R., Albrecht C., van Berlo D., Höhr D., Fubini B., Martra G., Fenoglio I., Borm P.J.A. and Schins R.P.F., 2007, Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles, *Toxicology and applied pharmacology*, 222 (2), pp. 141-151.



- Skuland T, Ovrevik J, Lag M, Schwarze P. and Refsnes M., 2014, Silica nanoparticles induce cytokine responses in lung epithelial cells through activation of a p38/TACE/TGF-alpha/EGFR-pathway and NF-kappaBeta signalling, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 279 (1), pp.76-86.
- Slowing I.I., Trewyn B.G. and Lin V.S.Y., 2006, Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (46), pp. 14792-14793.
- Slowing I.I., Trewyn B.G., Giri S. and Lin V.Y., 2007, Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications, *Advanced Functional Materials*, 17 (8), pp. 1225-1236.
- Slowing I.I., Vivero-Escoto J.L., Wu C.W. and Lin V.S.Y., 2008, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers, *Advanced drug delivery reviews*, 60 (11), pp. 1278-1288.
- Slowing I.I., Vivero-Escoto J.L., Zhao Y., Kandel K., Peeraphatdit C., Trewyn B.G. and Lin V.S.Y., 2011, Exocytosis of Mesoporous Silica Nanoparticles from Mammalian Cells: From Asymmetric Cell-to-Cell Transfer to Protein Harvesting, *Small*, 7 (11), pp. 1526-1532.
- Spicer P.T., Artelt C., Sanders S., and Pratsinis S.T., 1998, Flame synthesis of composite carbon black-fumed Silica nanostructured particles, *Journal of Aerosol Science* Vol. 29, No. 5/6, pp. 647-659.
- Stöber W. and Fink A., 1968, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 26, Iss. 1, pp. 62-69.
- Stoeger T., Reinhard C., Takenaka S., Schroepel A., Karg E., Ritter B., Heyder J. and Schulz H., 2006, Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice, *Environmental health perspectives*, pp. 328-333.
- Stover D.R., Becker M., Liebetanz J. and Lydon N.B., 1995, Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha, *J Biol Chem* 270: 15591-15597.
- Subbiah R., Veerapandian M. and Yun K.S., 2010, Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 17(36), pp. 4559-4577 (19).
- Sung J.H., Ji J.H., Park J.D., Yoon J.U., Kim D.S., Jeon K.S., Song M.Y., Jeong J., Han B.S., Han J.H., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Cho M.H., Kelman B.J. and Yu I.J., 2008, Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles, *Toxicological Sciences* 108(2), pp. 452 – 461.
- Sydlik U., Bierhals K., Soufi M., Abel J., Schins R.P.F and Unfried K., 2006, Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signalling pathway both using EGFR, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291: L725-L733.

- Sydlik, U., Gallitz, I., Albrecht, C., Abel, J., Krutmann, J. and Unfried, K., 2009, The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180 (1), pp. 29-35.
- Sylvestre J.-P., Kabashin A.V., Sacher E., Meunier M. and Luong J.H.T., 2004, Stabilization and Size Control of Gold Nanoparticles during Laser Ablation in Aqueous Cyclodextrins, *Journal of American Chemical Society* 126, 7176-7177.
- Tamaoki J., Isono K., Takeyama K., Tagaya E., Nakata J. and Nagai A., 2004, Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287 (6), L1127-L1133.
- Tang J. and Gross D.J., 2003, Regulated EGF receptor binding to F-actin modulates receptor phosphorylation, *Biochemical and biophysical research communications*, 312 (4), pp. 930-936.
- Tasis D., Tagmatarchis N., Georgakilas V. and Prato M., 2003, Soluble Carbon Nanotubes, *Chemistry Euro. J.*, Vol. 9, Iss. 17, pp. 4000–4008.
- Tatur S., Maccarini M., Barker R., Nelson A., and Fragneto G., 2013, Effect of Functionalized Gold Nanoparticles on Floating Lipid Bilayers, *Langmuir*, 2013, 29 (22), pp. 6606–6614.
- Tavernaro I., Cavelius C., Peuschel H. and Kraegeloh A., 2017, Bright fluorescent silica nanoparticle probes for high resolution STED and confocal microscopy, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, accepted.
- Taylor J.M., Cohen S. and Mitchell W.M., 1970, Epidermal Growth Factor: High and Low Molecular Weight Forms, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 67, No1, pp. 164-171.
- Taylor J.M., Mitchell W.M. and Cohen S., 1972, Epidermal growth factor physical and chemical properties, *Journal of Biological Chemistry*, 247 (18), pp. 5928-5934.
- Tekle C., Deurs B.V. Sandvig K. and Iversen T.G, 2008, Cellular trafficking of quantum dot-ligand bioconjugates and their induction of changes in normal routing of unconjugated ligands, *Nano letters*, 8 (7), pp. 1858-1865.
- Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H. Maskos M., Knauer S.K. and Landfester K., 2013, Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology, *Nature nanotechnology*, 8 (10), pp. 772-781.
- Thongkam W., Gerloff K., van Berlo D., Albrecht C. and Schins R.P.F., 2016, Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines, *Mutagenesis*, gew056.

- Treuel L., Jiang X. and Nienhaus, G.U., 2013, New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles, *Journal of The Royal Society Interface*, 10 (82), 20120939.
- Turci F., Ghibaudi E., Colonna M., Boscolo B., Fenoglio I. and Fubini B., 2010, An integrated approach to the study of the interaction between proteins and nanoparticles, *Langmuir*, 26 (11), pp. 8336-8346.
- Turkevich J., Stevenson P.C. and Hillier J., 1951, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussion Faraday Soc.*, 11, 55-75.
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L.O., Von Mikecz A., Grether-Beck S. and Schins, R.P.F., 2007, Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms, *Nanotoxicology*, 1 (1), pp. 52-71.
- Unfried K., Sydlik U., Bierhals K., Weissenberg A. and Abel J., 2008, Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L358 - L367.
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L.-O., Von Mikecz A., Grether-Beck S. and Schins R.P.F., 2009, Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms, *Nanotox.*, Vol. 1, Iss. 1, pp. 52-71.
- Verdun C., Brasseur F., Vranckx H., Couvreur P. and Roland M., 1990, Tissue distribution of doxorubicin associated with polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 26 (1), pp. 13-18.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. and Reutelingsperger C., 1995, A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 184, Iss. 1, pp. 39-51.
- Vieira A.V., Lamaze C. and Schmid S.L., 1996, Control of EGF Receptor Signaling by Clathrin-Mediated Endocytosis, *Science* Vol. 274, Iss. 5295, pp. 2086-2089.
- Vlasova I.I., Kapralov A.A., Michael Z.P., Burkert S.C., Shurin M.R., Star A., Shvedova A.A. and Kagan V.E., 2016, Enzymatic oxidative biodegradation of nanoparticles: Mechanisms, significance and applications, *Toxicology and applied pharmacology*, 299, pp. 58-69.
- Walkey C.D., Olsen J.B., Song F., Liu R., Guo H., Olsen D.W.H., Cohen Y., Emili A. and Chan W.C., 2014, Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles, *ACS nano*, 8 (3), pp. 2439-2455.
- Wang J., Jensen U.B., Jensen G.V., Shipovskov S., Balakrishnan V.S., Otzen D., Pedersen J.S., Besenbacher F. and Sutherland D.S., 2011, Soft interactions at nanoparticles alter protein function and conformation in a size dependent manner, *Nano letters*, 11 (11), pp. 4985-4991.

- Wang L.H., Rothberg K.G. and Anderson R.G., 1993, Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation *The Journal of cell biology*, 123 (5), pp. 1107-1117.
- Warheit D.B., McHugh T A. and Hartsky M.A., 1995, Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scandinavian journal of work, environment & health*, pp. 19-21.
- Waterman H., Sabanai I., Geiger B. and Yarden, Y., 1998, Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (22), pp. 13819-13827.
- Weissenberg A., Sydlik U., Peuschel H., Schroeder P., Schneider M., Schins R.P.F., Abel J. and Unfried K., 2010, Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 49, pp. 597-605.
- Wijaya A., Schaffer S.B., Pallares I.G. and Hamad-Schifferli K., 2009, Selective Release of Multiple DNA Oligonucleotides from Gold Nanorods, *ACS Nano*, 3 (1), pp. 80–86.
- Wilson M.R., Foucaud L., Barlow P.G., Hutchison G.R., Sales J., Simpson R.J. and Stone V., 2007, Nanoparticle interactions with zinc and iron: Implications for toxicology and inflammation, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 225, Iss. 1, 15, pp. 80–89.
- Wulf E., Deboen A., Bautz F.A., Faulstich H. and Wieland T., 1979, Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (9), pp. 4498-4502.
- Xia T., Kovoichich M., Liong M., Meng H., Kabehie S., George S., Zink J.I. and Nel A.E., 2009, Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs, *ACS nano*, 3 (10), pp. 3273-3286.
- Yang W., Peters J.I. and Williams R.O., 2008, Inhaled nanoparticles - A current review, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 356, Iss. 1–2, pp. 239–247.
- Yang W., Zhang L., Wang S., White A.D. and Jiang S., 2009, Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly (carboxybetaine) in undiluted blood serum. *Biomaterials*, 30 (29), pp. 5617-5621.
- Yarden Y., 2001, The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities, *Europ Jour of Cancer* 37, S3-S8.
- Yoon Y.K., Kim H.P., Han S.W., Oh D.Y., Im S.A., Bang Y.J. and Kim T.Y., 2010, KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach, *Molecular carcinogenesis*, 49 (4), pp. 353-362.
- Yumoto R., Nishikawa H., Okamoto M., Katayama H., Nagai J. and Takano M., 2006, Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line

- RLE-6TN, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290 (5), pp. L946-L955.
- Zamai L., Falcieri E., Marhefka G. and Vitale M., 1996, Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation, *Cytometrie*, Vol. 23, Issue 4, pp. 303–311.
- Zhang H., Dunphy D.R., Jiang X., Meng H., Sun B., Tarn D., Xue M., Wang X., Lin S., Ji Z., Li R., Garcia F.L., Yang J., Kirk M.L., Xia T., Zink J.I., Nel A. and Li, R., 2012, Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: colloidal vs pyrolytic, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (38), pp. 15790-15804.
- Zhao H. and Douglas E.P., 2002, Preparation of corona-embedded CdS nanoparticles, *Chemistry of materials*, 14 (3), pp. 1418-1423.
- Zhu J., Liao L., Zhu L., Zhang P., Guo K., Kong J., Ji C. and Liu B., 2013, Size-dependent cellular uptake efficiency, mechanism, and cytotoxicity of silica nanoparticles toward HeLa cells, *Talanta*, 107, pp. 408-415.
- Zwick E., Hackel P.O., Prenzel N. and Ullrich A., 1999, The EGF Receptor as central transducer of heterologous signalling systems, *TiPS*, Vol. 20, pp. 408-412

## 6. AnhangAufführung aller verwendeten Partikelchargen

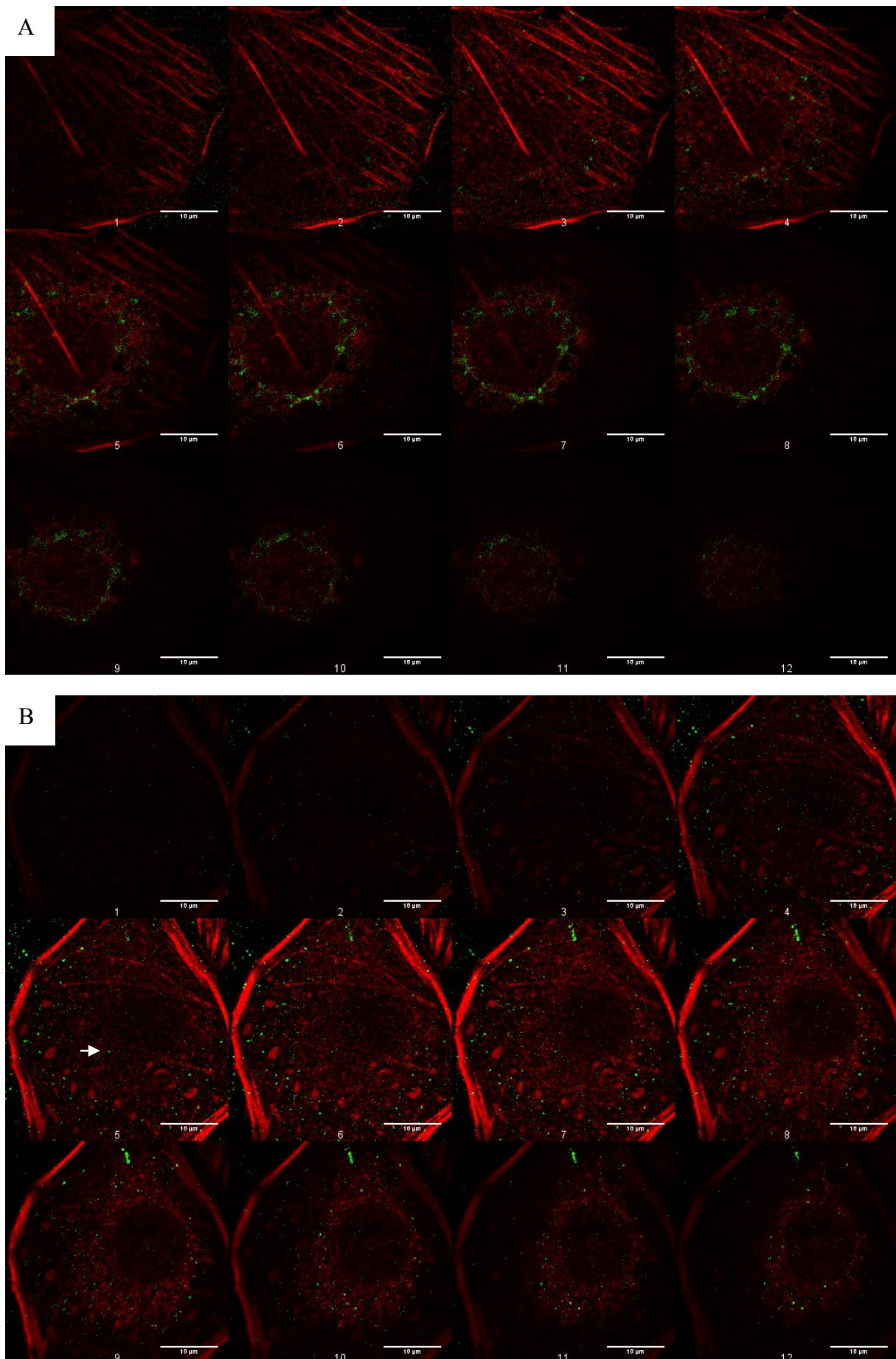
### 6.1.1 Me-Serie

Synthesename	Synthese-Datum	Silizium-Gehalt [mg Si/Liter]	Silika-Gehalt [g SiO <sub>2</sub> /Liter]	Partikel-Durchmesser [nm]	ζ-Potential [mV]
Me15-B_scw	25.07.2012	2241 ± 23	4,802	14 ± 0,5	- 29
Me15-F_scw_06	30.09.2013	2448 ± 16	5,246	8 ± 2	- 12
Me15-F_scw_01	30.09.2013	2719 ± 28	5,826	12 ± 1	- 13
Me15-K_scw	07.03.2016	1893 ± 16	4,056	15 ± 1	- 21
Me25-B_scw	24.07.2012	1584 ± 17	3,394	25 ± 2	- 43
Me25-F_scw_03	16.09.2013	1982 ± 9	4,247	23 ± 2	- 27
Me25-F_scw_06	16.09.2013	2047 ± 20	4,386	24 ± 5	- 26
Me25-H_scw_01	17.03.2015	3061 ± 21	6,559	22 ± 2	- 30
Me25-L_scw	08.03.2016	2558 ± 36	5,481	21 ± 2	- 24
Me80-B_scw	09.08.2012	1011 ± 7	2,166	87 ± 2	- 39
Me80-F_scw_04	09.10.2013	1639 ± 27	3,512	89 ± 26	- 37
Me80-H_scw_01	25.03.2015	1408 ± 11	3,017	84 ± 3	- 35
Me80-G_scw_01	01.09.2014	1472 ± 15	3,154	82 ± 4	- 35
Me80-K_scw	08.03.2016	1378 ± 22	2,953	82,1 ± 3	- 28
Me80-L_scw	16.03.2016	1535 ± 16	3,289	88,0 ± 22	- 28

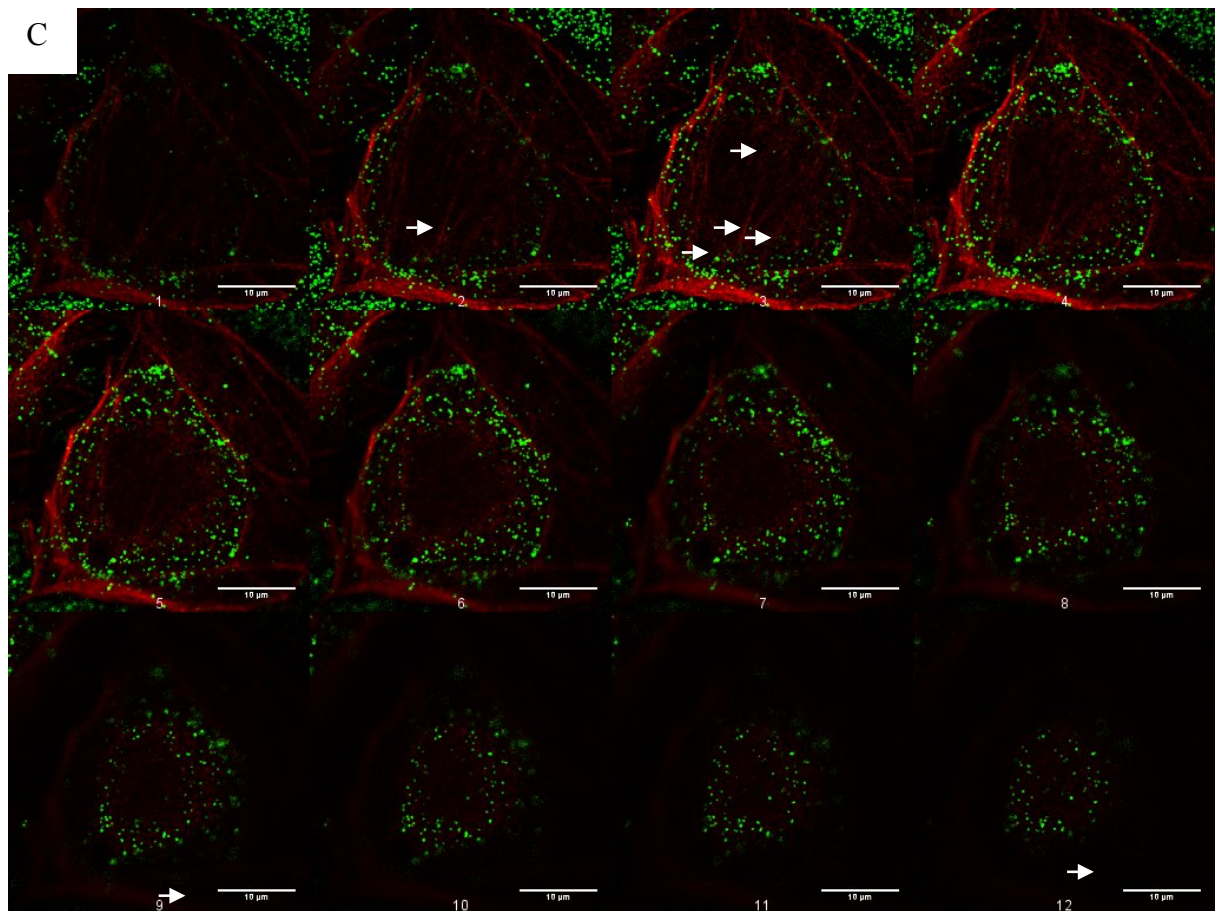
## 6.1.2 Fd-Serie

Synthesename	Synthese-Datum	Silizium-Gehalt [mg Si/Liter]	Silika-Gehalt [g SiO <sub>2</sub> /Liter]	Partikel-Durchmesser [nm]	ζ-Potential [mV]
Fd15-A_scw_01	23.09.2014	2117 ± 25	4,536	14 ± 1	- 15
Fd15-B_scw_02	05.11.2014	457 ± 0	0,979	15 ± 1	- 19
Fd15-B_scw_02	05.11.2014	456 ± 8	0,979	12 ± 3	- 19
Fd15-BB_scw	07.03.2016	1014 ± 6	2,173	15 ± 1	- 16
Fd25-H_scw	15.09.2014	3743 ± 22	8,021	25 ± 2	- 31
Fd25-K_scw	02.03.2015	2392 ± 4	5,126	27 ± 3	- 21
Fd80-H_scw_01_8h	30.09.2014	431 ± 16	0,923	91 ± 2	- 31
Fd80-L_scw	23.07.2015	1441 ± 10	3,088	98 ± 3	- 24

## 6.2 Kolokalisation von SiNP und EGFR (Einzelbilder der Bilderstapel)



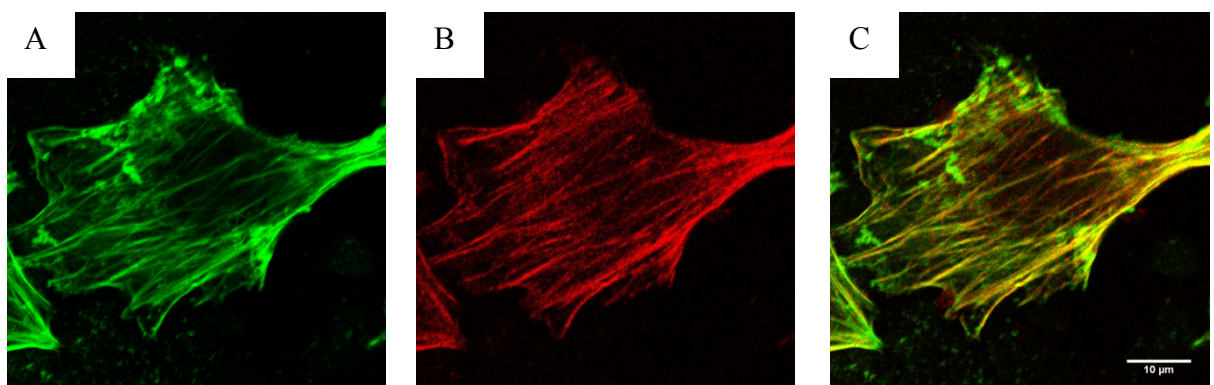




**Abbildung 6.2:** . Kolokalisation der Silikananopartikel und dem EGFR (Einzelbilder der Bilderstapel). RLE-Zellen wurden für 5 Minuten mit 33 µg/ml Nanopartikeln inkubiert und im Anschluss wurde der EGF-Rezeptor gefärbt. **A:** Si15; **B:** Si25; **C:** Si80. Grün: Nanopartikel; rot: EGFR.

Die weißen Pfeile markieren internalisierte Partikel, die sich nicht auf der Oberfläche der Zellen befinden; die Nummerierung der Bilder verläuft von der Deckglasebene (1) bis zur Zellspitze (12).

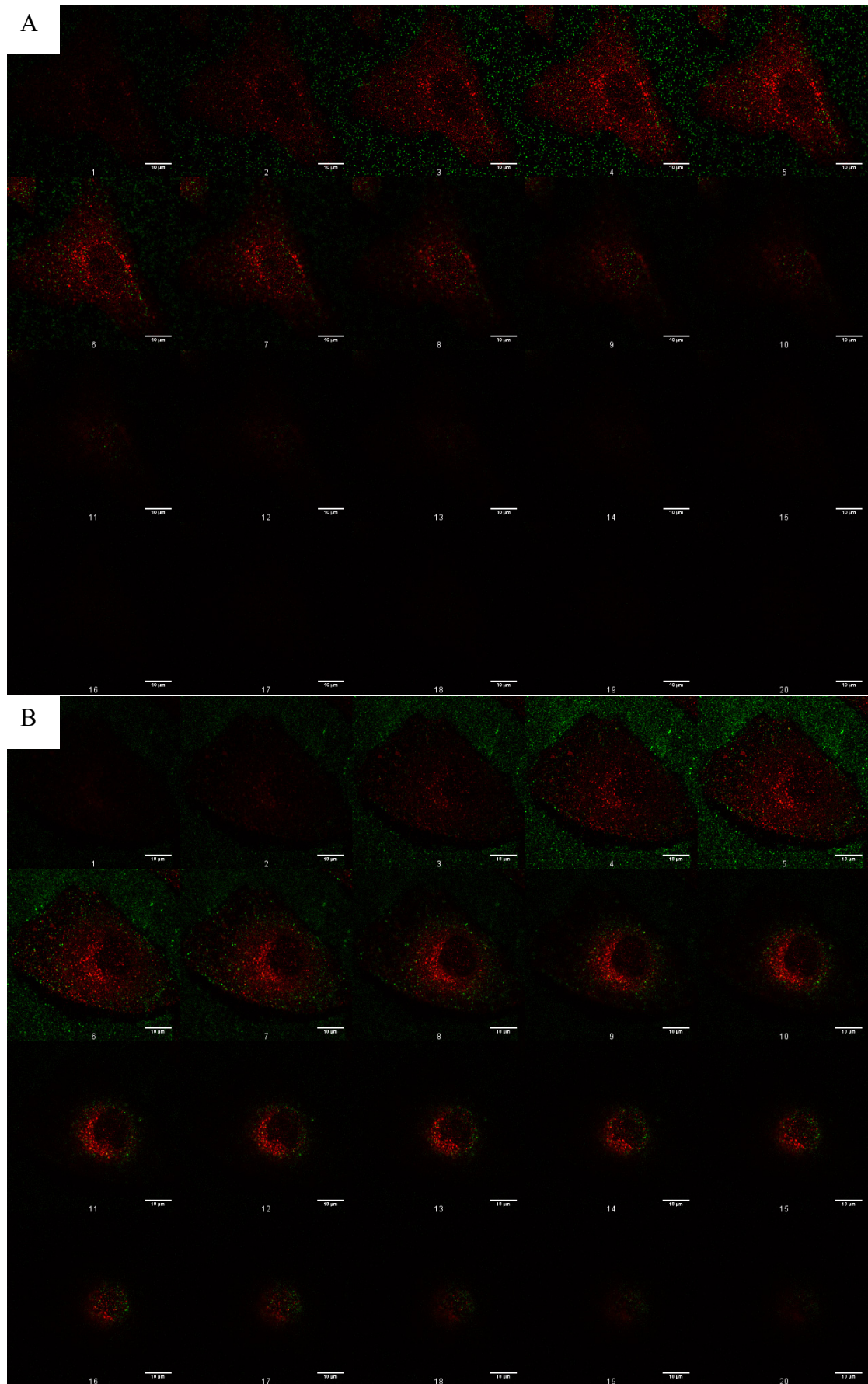
### 6.3 Aktin EGFR Interaktion

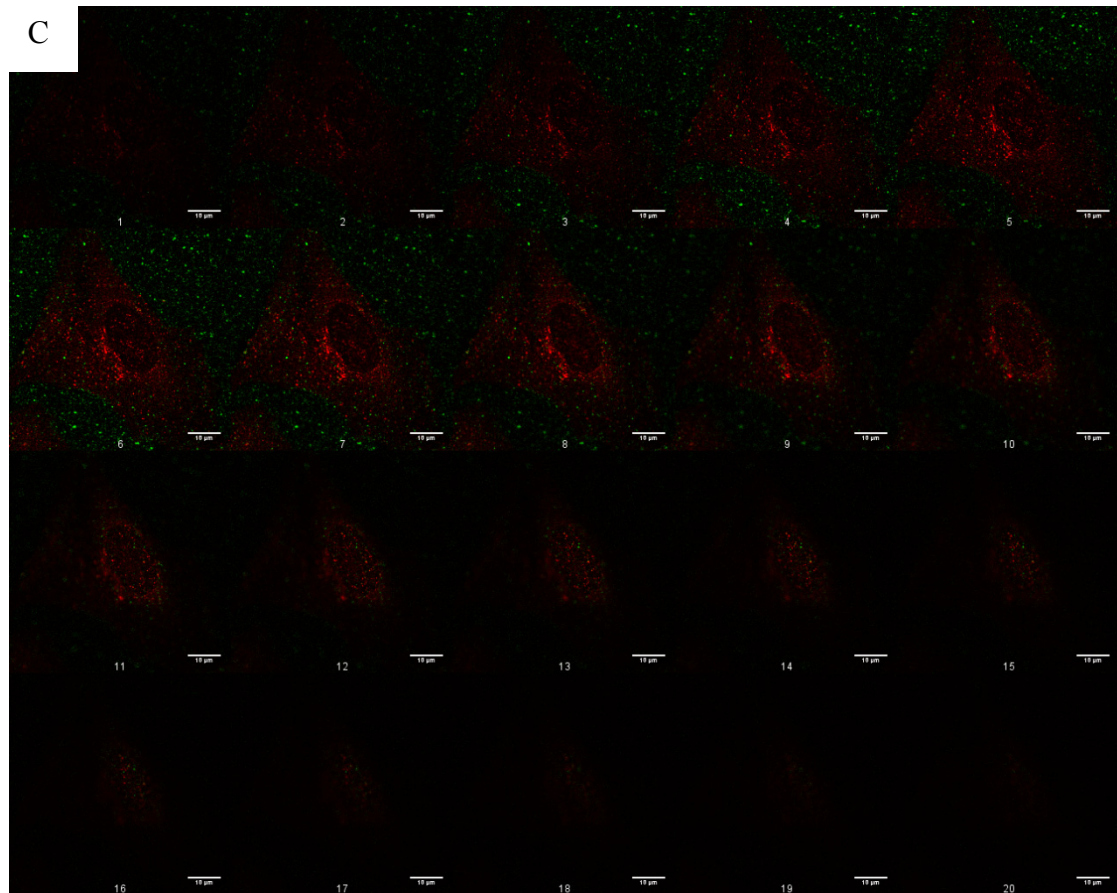


**Abbildung 6.3:** Interaktion zwischen Aktin und EGFR. RLE-Zellen wurden fixiert und Aktin (grün) und der EGFR (rot) gefärbt. **A:** Aktin; **B:** EGFR; **C:** Merge.

Aktin und EGFR kolokalisieren an der Membran und bilden das klassische Aktinskelett ab.

## 6.4 Frühe Endosomen (EEA1 Einzelbilder der Bilderstapel)





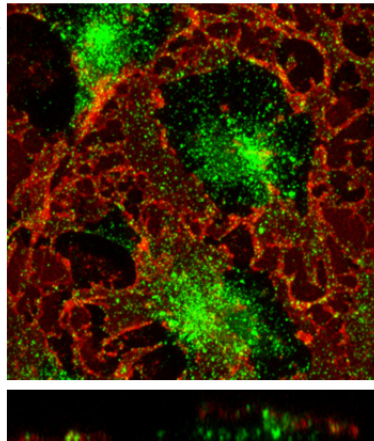
**Abbildung 6.4: Frühe Endosomen nach Inkubation mit Silikananopartikeln (Einzelbilder der Bilderstapel).** RLE-Zellen wurden für 30 min mit 33 µg/ml SiNP belastet. **A:** Si15; **B:** Si25; **C:** Si80. Grün: Silika Nanopartikel; Rot: Frühe Endosomen (EEA1-Antikörper).

Die Nummerierung der Bilder verläuft von der Deckglasebene (1) bis zur Zellspitze (20).

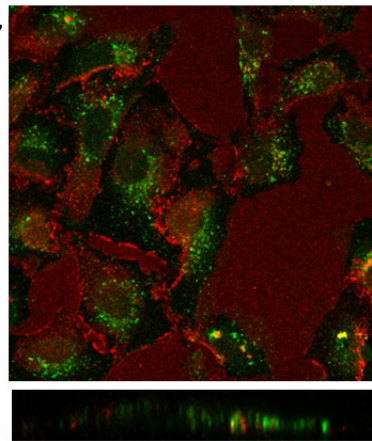
## 6.5 Rab7-Färbung: Detektion von SiNP in späten Endosomen (Zeitreihe)

A: Si15

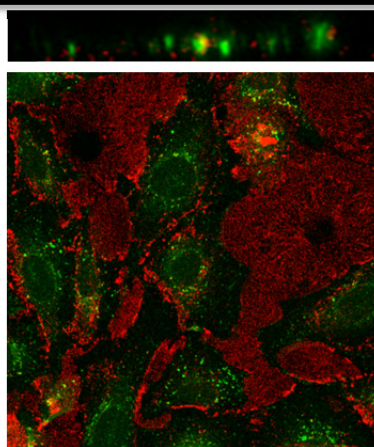
90'



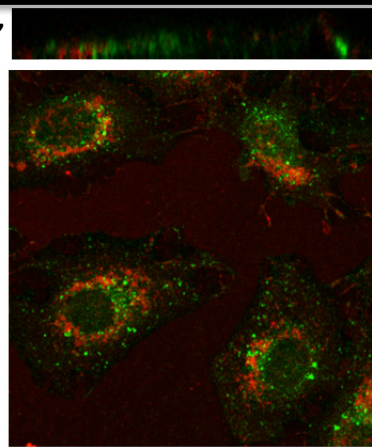
60'



30'

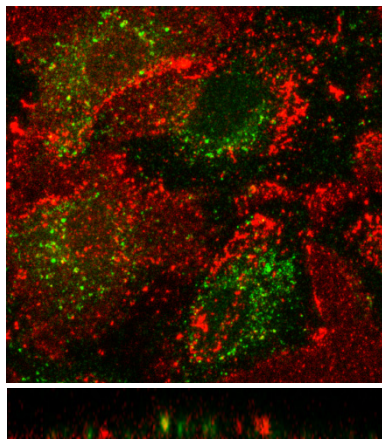


5'

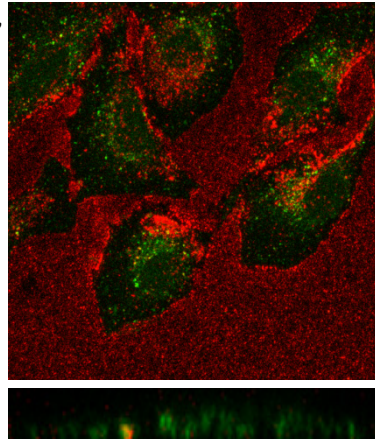


B: Si25

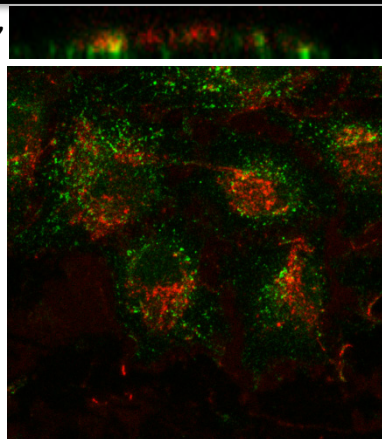
90'



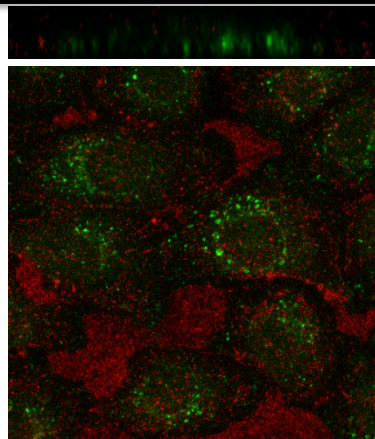
60'



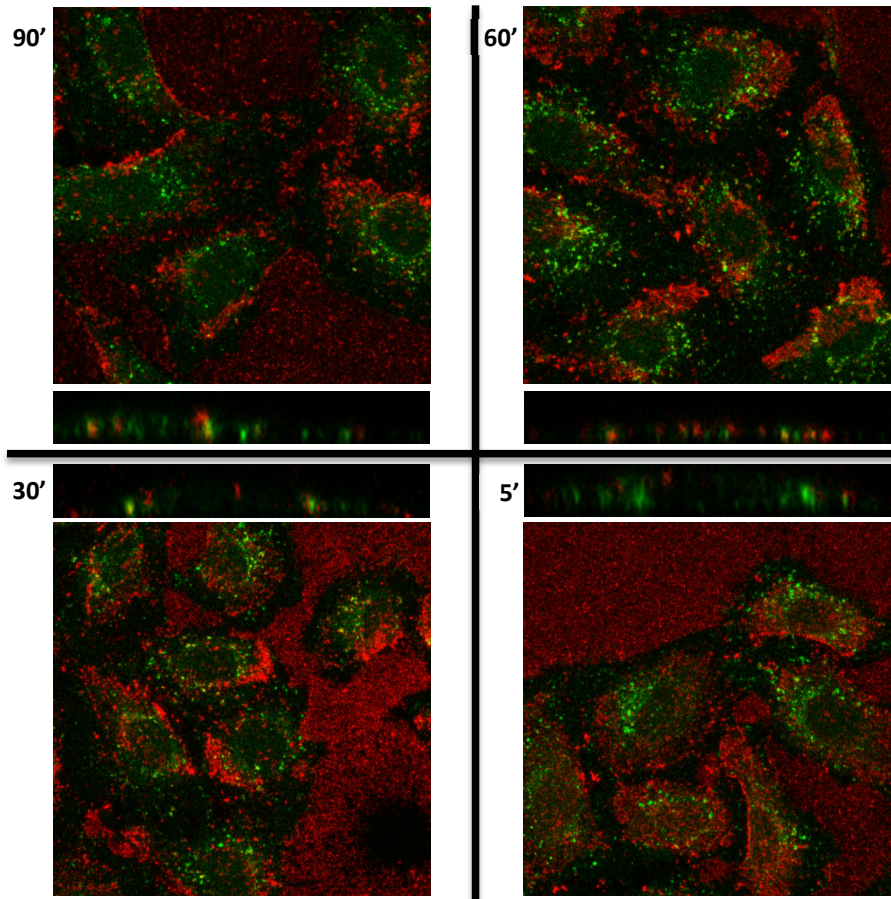
30'



5'



C: Si80



**Abbildung 6.5:** Abbildungen der Zeitreihe zum Partikeltransport in Rab7-gefärbten Vesikeln (späte Endosomen). RLE-Zellen wurden für 5, 30, 60 und 90 min mit 33  $\mu\text{g/ml}$  Nanopartikeln belastet. **A:** Si15; **B:** Si25; **C:** Si80. Gezeigt sind Übersichtsbilder der maximalen Fluoreszenzintensitäten von Bilderstapeln und orthogonale Darstellungen dieser Bilderstapel. Grün: Späte Endosomen (Rab7-Antikörper); Rot: Silikananopartikel.

## **Danksagung**

Diese Arbeit konnte ich an zwei sich gut ergänzenden Leibniz-Instituten durchführen. Ich danke besonders Dr. Annette Kraegeloh und Dr. Klaus Unfried für ihr Vertrauen in mich und ihre Führung während des gesamten Promotionsvorhabens.

Weiterhin gebührt mein Dank für ihre Geduld den Kollegen aus den Arbeitsgruppen Partikel-Zell Interaktion am IUF, Daniel, Chrissi, Tim, Tamara, Ragnhild und Winfried sowie Nano Zell Interaktionen am INM, Silke, Henrike, Christian, Sarah, Anika, Kathrin, Isabella, Jenny, Thomas, Jana und Marcus.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für den Rückhalt außerhalb des Labors.

## Curriculum Vitae

### Ausbildung

2014	Fortführung der Promotion am Leibniz-Institut für Neue Materialien
2013	Beginn der Promotion (Dr. rer. nat.) am Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung in Düsseldorf
2010-2012	Master-Studium im Fach Toxikologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf (Note: 1,9)  Masterarbeit: <i>Vergleich der toxischen Eigenschaften von Gold-, Silber- und Magnetitnanopartikeln</i> (Note: 1,3)
2011	Versuchstierkundliche Einführung (Tierversuchsschein nach § 9 TierSchG)
2007-2010	Bachelor-Studium (sechs Semester) im Fach Biologie an der Ludwig-Maximilian-Universität in München (Note: 3,1)  Bachelorarbeit: <i>Demaskierung von Sprachsignalen durch Maskierermodulation bei jungen und alten Menschen</i> (Note: 1,2)
2006	Abitur am Gymnasiums am Oelberg/Königswinter
1996-2006	Besuch des Gymnasiums am Oelberg/Königswinter
1992-1996	Besuch der Grundschule in Stieldorf/Königswinter

### Weiterbildung und berufliche Tätigkeiten

2013	Teilnahme am Seminar ‚Statistik (SPSS) für Mediziner‘ der Medical Research School Düsseldorf
2013	Teilnahme am iGRAD-Seminar ‚Good Laboratory Practice for Doctoral Researchers‘
2012	Forschungsreise zum ‚Ruđer Bošković Institute‘ in Zagreb, Kroatien
2012	Studentische Hilfskraft in der Tierversuchsanlage des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung

## Konferenzen und Workshops

2016	11 <sup>th</sup> BioBarrier Conference, Saarbrücken, Deutschland
2015	5 <sup>th</sup> Leica Super Resolution Club, Amsterdam, Niederlande
2014	Symposium des Leibniz Forschungsverbundes ‚Nanosicherheit‘, Berlin, Deutschland
2013	Nanosafety, Saarbrücken, Deutschland
2013	10 <sup>th</sup> International Particle Toxicology Conference, Düsseldorf, Deutschland

## Sonstige Tätigkeiten

2008 - 2010	Trainer für Fitness und Ausdauer für Teilnehmer ab 40 J. im FTM Blumenau/München
2008 - 2009	Aushilfstätigkeit im Einzelhandel
2006 - 2007	Zivildienst im ev. Kinderheim Probsthof in Königswinter
2002 - 2007	Ausbildung zum Übungsleiter C im Bereich Turnen und Breitensport Führung von zwei Jugendsportgruppen im TVR Rauschendorf/Königswinter

## Besondere Kenntnisse

### Sprachen

Deutsch	(Muttersprache)
Englisch	(verhandlungssicher)
Spanisch	(Grundkenntnisse)
Französisch	(Grundkenntnisse)



## **Erklärung an Eides statt**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Zitate sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form einem anderen Prüfungsamt vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Düsseldorf,

---

Alexander Kümper