

**Der Einfluss von Nanopartikeln  
auf physiologische Parameter von Zellen**

**Dissertation**

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

von

Diplom-Biologe

**Daniel Mörsdorf**

Saarbrücken

2012



*"There are many people, including myself, who are quite queasy about the consequences of this technology for the future. We are talking about changing so many things that the risk of society handling it poorly through lack of preparation is very large."*

K. Eric Drexler, 1986, *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*  
Anchor Books, New York, USA

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Verwendete biologische Systeme	5
2.1.1	Blut und Erythrozyten	5
2.1.2	Caco-2-Zellen	6
2.2	Biologische Membranen	7
2.2.1	Membranaufbau	7
2.2.2	Membranlipide	8
2.2.3	Membranproteine	11
2.2.4	Ionen-transport	11
2.2.5	Bewegung von Membrankomponenten	15
2.2.6	Zelluläre physiologische Parameter	16
	Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration	17
	Intrazellulärer pH-Wert	19
	PS-Exposition	21
	Transmembranpotenzial	22
2.2.7	Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen	23
2.3	Fluoreszenz	25
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Geräte	28
3.1.1	Chemikalien und Lösungen	28
3.1.2	Geräte	30
3.2	Verwendete biologische Zellen	32
3.2.1	Erythrozyten	32
3.2.2	Caco-2-Zellen	32
3.3	Nanopartikel	33
3.3.1	Magnetische Eisenoxid ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )-Nanopartikel	33
3.3.2	Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ )-Nanopartikel	35

---

3.3.3	Gold (Au)-Nanopartikel	36
3.4	Polyurethan (PU)-Nanofasern	37
3.5	Nanostrukturierte Oberflächen	37
3.6	Kohlenhydrat-synthetisierte Polypeptide	38
3.7	Fluoroalkylierte Phosphate	40
3.8	Hämatokritwert-Bestimmungen	41
3.9	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	42
3.10	Fluoreszenzspektroskopische Messungen des intrazellulären pH-Wertes und der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	49
3.10.1	Fluoreszenzspektroskopische Messung des intrazellulären pH-Wertes	50
3.10.2	Fluoreszenzspektroskopische Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	51
3.11	Fluoreszenzmikroskopische Messungen des intrazellulären pH und der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration, Analyse der Form von Erythrozyten	52
3.11.1	Fluoreszenzmikroskopische Messung des intrazellulären pH-Wertes	52
3.11.2	Fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	53
3.11.3	Auswertung der Fluoreszenzmessungen	53
3.11.4	Analyse der Zellform	54
3.12	Durchflusszytometrische Fluoreszenzmessungen der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration, der PS-Exposition und des Membranpotenzials	54
3.12.1	Durchflusszytometrische Messung der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	54
3.12.2	Durchflusszytometrische Messung der PS-Exposition	55
3.12.3	Messung des Membranpotenzials	56
3.13	Aufnahme von Nanopartikeln	56
3.14	Zytotoxizitäts-Test	57
3.14.1	LDH-Test	57
3.14.2	XTT-Test	58

---

3.15	Statistik	58
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1	Nanopartikel	60
4.1.1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel	60
4.1.2	SiO <sub>2</sub> -Nanopartikel	75
4.1.3	Au-Nanopartikel	80
4.2	PU-Nanofasern	84
4.4	Kohlenhydrat-synthetisierte Polypeptide	90
4.5	Fluoroalkylierte Phosphate	93
4.6	Messung des Membranpotenzials von Erythrozyten	99
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
5.1	Nanopartikel	102
5.1.1	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel	102
5.1.2	SiO <sub>2</sub> -Nanopartikel	106
5.2	PU-Nanofasern	110
5.3	Nanostrukturierte Oberflächen	111
5.4	Kohlenhydrat-synthetisierte Polypeptide	112
5.5	Fluoroalkylierte Phosphate	113
5.6	Messung des Membranpotenzials von Zellen	117
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>122</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>135</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>140</b>
<b>11.</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>142</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>144</b>

---

## 1. Einleitung

Norio Taniguchi von der Tokyo University of Science, verwendete 1974 als Erster den Begriff der Nanotechnologie. Die Nanotechnologie (und damit verbunden auch die Nanobiotechnologie) gilt als eine der innovativsten Zukunftstechnologien heutzutage. Neben Chemie, Elektronik, Physik und anderen Wissenschaftsfeldern hat die Nanotechnologie auch einen wachsenden Einfluss auf Life Sciences, die Biologie und Medizin. Statt in den Dimensionen immer größer zu werden, hat sich die Nanotechnologie darauf verschrieben, Produkte in einem kleiner werdenden Maßstab zu entwickeln. Allgemeine Definitionen beschreiben Nanotechnologie als die Produktion von Produkten und Komponenten bis zu einer Größe von 100 nm. Ausschlaggebend ist hier jedoch, dass die geringe Größe neue Eigenschaften der Produkte mit sich bringt.

In der Nanobiotechnologie werden Nanopartikel und Materialien für verschiedenste Anwendungen entwickelt. So werden sie zum Beispiel für Systeme zum gezielten Transport von Wirkstoffen an ihren Wirkort (drug delivery), der Minimierung der Toxizität (Zhang et al., 2008), zu Steigerung von Aufnahmeraten von Wirkstoffen (und damit einer Minimierung der Dosierung), zur Diagnose und dem Überwachen bestimmter Krankheiten oder zur Krebstherapie durch magnetische oder thermische Eigenschaften dieser Nanopartikel (Pankhurst et al., 2003; Liu et al., 2007; Park et al., 2009) eingesetzt.

Viele dieser Nanopartikel wurden im Bezug auf ihre Interaktion mit den von ihnen angezielten Geweben oder Zellen ausführlich untersucht. Oftmals ist es jedoch unklar, ob diese Nanopartikel unspezifische Reaktionen mit anderen Geweben oder Zellen zeigen, mit denen sie in Kontakt kommen können (Nel et al., 2006, Geiser et al., 2004, Hillyer et al., 2001). So können zum Beispiel Nanopartikel, welche in den Blutkreislauf injiziert werden und damit in Kontakt mit Erythrozyten kommen, womöglich an deren Oberfläche adhären oder sogar in diese eindringen. Solch eine Aufnahme von Nanopartikeln in Erythrozyten wurde von Geiser et al. (2005) und Rothen-Rutishauser et al. (2006) berichtet. In beiden

Fällen wird der Nanopartikel jedoch nicht zu den Zielzellen transportiert. Zusätzlich könnten Nanopartikel physiologische Parameter der Zellen beeinflussen. Beispielsweise wurde berichtet, dass Eisenoxid-Nanopartikel die Membranpermeabilität von menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen erhöhen können (Apopa, 2009).

Ein weiterer Gesichtspunkt für ausführlichere Betrachtungen von Risikofaktoren von Nanopartikeln bzw. Nanotechnologien in medizinischen Anwendungen zeigen neuste soziologische Studien. Da genaue Risiken oftmals nicht bekannt sind und juristische Regulatoren für Nanotechnologien nur unzureichend existieren (Boucher, 2008), besteht in der Gesellschaft ein gewisser Grad an Ablehnung und Angst vor unbekanntem Risiken, die der Einsatz von Nanotechnologien mit sich bringen kann (Ach und Siep, 2006; Satterfield, 2009). Somit haben Risikoforschungen im Bereich der Nanotoxikologie einen wichtigen Einfluss auf die Akzeptanz von neuen Nanotechnologien und können verhindern, dass eben diese eine ähnlich kritische Betrachtung und Ablehnung in der Bevölkerung erhalten wie nukleare oder biotechnologische Innovationen, so zum Beispiel bei der Debatte um gentechnisch veränderte Organismen (GVO).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Biophysik von Prof. Dr. Ingolf Bernhardt an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken angefertigt und beschäftigt sich mit der Nanotoxizität von verschiedenen Nanopartikeln und nanostrukturierten Oberflächen und deren Einfluss auf wichtige physiologische Parameter von Zellen. Als Zellparameter wurden der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und der intrazelluläre pH-Wert untersucht, jeweils an zwei verschiedenen Zelltypen, Erythrozyten und Caco-2 Zellen. Während Caco-2 Zellen eine Aufnahme von Nanopartikeln durch Endozytose (Fogh und Trempe, 1975) zeigen, besitzen Erythrozyten keinen solchen Mechanismus. Das bedeutet, dass Nanopartikel, welche innerhalb von Erythrozyten zu finden sind, deren Membran über einen noch nicht weiter bekannten passiven Weg passieren müssten (Rothen-Rutishauser et al., 2006). Verschiedene Nanopartikel wurden miteinander verglichen, neben magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln auch



Siliciumoxid-Nanopartikel und Gold-Nanopartikel verschiedener Größen. Daneben wurden auch einzelne Komponenten zur Nanopartikel-Herstellung betrachtet, da die Stabilität der Nanopartikel nicht immer vollständig gewährleistet ist. Der größte Teil der vorliegenden Arbeit basiert auf einem Teilprojekt im Rahmen des EU-Projektes *Magnetic Nanoparticles combined with submicronic bubbles and dye for oncology imaging* (NanoMagDye, NMP3-SL-2008-214032, FP7 2007-2013). Im Projekt wurde eine verbesserte Methode zur Detektion von mit Krebszellen befallenen Lymphknoten entwickelt. Während die zurzeit eingesetzten Systeme eine Farbstoff- und Radionuklid-Markierung beinhalten, ist das Ziel des neu entwickelten Systems, eine höher auflösende Detektion frei von ionisierender Strahlung zu gewährleisten. Hierfür wurden biokompatible Nanoobjekte mit magnetischen und optischen Eigenschaften auf Basis von Eisenoxid-Nanopartikeln synthetisiert. Diese Nanopartikel werden im Verbund mit stabilisierten Mikrobläschen eingesetzt, um bei Ultraschalluntersuchungen als Kontrastmittel zu agieren. Die Kombination verspricht eine sicherere und verbesserte Analyse und Detektion der Knoten. Die von IPCMS und ICS, Strasbourg hergestellten Nanopartikel und Substanzen wurden im Projekt auf ihre Toxizität untersucht. Darüber hinaus wurde in Zusammenarbeit mit dem Dr. Annette Kraegeloh, Leibniz Institut für neue Materialien, INM, Saarbrücken die Toxizität von Siliziumoxid-Nanopartikeln analysiert. Ebenso wurden von Dr. Marc Schneider, Pharmazeutische Nanotechnologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken Gold-Nanopartikel für entsprechende Untersuchungen bereitgestellt.

Zusätzlich zum Einfluss von Nanopartikel auf physiologische Parameter wurde auch der Effekt von nanostrukturierten Oberflächen auf diese oben genannten Parameter und die Form von Erythrozyten untersucht. Dass Erythrozyten einer Formveränderung (Stomatozyt ↔ Discozyt ↔ Echinozyt) unterliegen können, wenn sie in Kontakt mit artifiziellen Oberflächen kommen, ist bereits länger bekannt (Betz et al., 2007), wie dieser Effekt bei nanostrukturierten Oberflächen aufgrund deren spezieller Eigenschaften ausfällt, ist jedoch noch ungelöst und muss für die Anwendung in Frage gestellt werden. So wurden nanostrukturierte Oberflächen mit unterschiedlich beschichteten Siliciumoxid-Oberflächen

(bereitgestellt von Dr. Maria Milanova, St.-Kliment-Ohridski-Universität, Sofia, Bulgarien) und zu einem Netz verwobene Fasern aus Polyurethan (Nanofasern, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Marina Voinova, Technische Hochschule Chalmers, Göteborg, Schweden) verwendet. Diese Polyurethan-Nanotubes sollen als Wundverband eingesetzt werden und haben so einen direkten Kontakt mit Blut und damit auch mit Erythrozyten. Eine beeinflusste Zellform oder veränderte physiologische Parameter von Zellen könnten somit die Wundheilung verhindern oder verlangsamen.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Verwendete biologische Systeme

#### 2.1.1 Blut und Erythrozyten

Blut (lat. Sanguis) ist eine Körperflüssigkeit, die durch das Herz-Kreislauf-System vielfältige Versorgungs- und Verknüpfungsaufgaben für die Funktionen verschiedener Körpergewebe sicherstellt. Der Anteil des Blutes am Körpergewicht eines Menschen beträgt etwa 6 - 8%, was einem Volumen von 4 - 6 Litern entspricht. Es besteht aus speziellen Zellen (bei Männern ca. 44% - 46%, bei Frauen ca. 41% - 43%) und dem proteinreichen Blutplasma, das als Träger dieser Zellen fungiert. Bei Neugeborenen beträgt der Hämatokrit (Anteil an Erythrozyten im Blut) 60%, bei Kleinkindern nur noch 30% und steigt dann bis zum Erwachsenenalter an. Weitere Bestandteile des Blutplasmas sind Hormone, gelöste Gase und Nährstoffe wie Zucker, Lipide und Vitamine, die zu den Zellen, und Abbau- und Stoffwechsel-Produkte, die von den Zellen weg transportiert werden.

Im hämatopoetischen Gewebe (bei Neugeborenen in der Milz und der Leber, bei Erwachsenen im roten Knochenmark) differenzieren pluripotente Stammzellen in verschiedene Zelltypen. So werden aus ihnen neben den 99% an Erythrozyten auch Leukozyten und Thrombozyten gebildet.

Die jüngsten Erythrozyten, die das blutbildende Gewebe verlassen, sind Retikulozyten. Sie verlassen das Knochenmark ein bis zwei Tage nachdem sie den Zellkern verloren haben und enthalten noch Reste von RNA und Zellorganellen. Neben geeigneten Färbemethoden (zum Beispiel Supravitalfärbung oder Brillantkresylblaufärbung) sind sie auch an ihrem im Vergleich zu adulten Erythrozyten größeren Zellvolumen erkennbar. Der Anteil an Retikulozyten im peripheren Blut liegt bei gesunden, erwachsenen Menschen um etwa ein Prozent. Eine Veränderung der Retikulozytenmenge im Blut lässt somit

direkte Rückschlüsse auf eine verminderte oder verstärkte Erythropoese zu, was bei der Differenzierung von Anämien (Blutarmut) als Merkmal herangezogen wird. Im Blut reifen Retikulozyten dann zu Erythrozyten heran.

Reife Erythrozyten vom Menschen sind zellkernlose, membranumschlossene Systeme ohne Organellen. Dies bedeutet für Erythrozyten, dass sie sich von anderen Zelltypen zum Teil stark unterscheiden. Im Gegensatz zu diesen sind sie nicht in der Lage, Proteine zu synthetisieren oder zu modifizieren. Da ihnen auch die Mitochondrien fehlen, müssen sie ihren Energiebedarf durch anaerobe Glykolyse decken. Dies hat den Vorteil, dass sie den Sauerstoff, welchen sie zum Transport aufgenommen haben, nicht selbst verbrauchen. Die Hauptaufgabe, der Transport von Sauerstoff zum Gewebe, wird mithilfe des Chromoproteins Hämoglobin erfüllt, welches etwa ein Drittel des Zellvolumens von Erythrozyten einnimmt. Sauerstoff wird in der Lunge an das allosterische Protein Hämoglobin gebunden, im Blutkreislauf zu fast allen lebenden Zellen (mit Ausnahme der Hornhaut des Auges und des Knorpels, beide werden durch Diffusion mit Sauerstoff versorgt) transportiert und abgegeben. Hämoglobin hat ein Absorptionsmaximum bei etwa 400 nm, was für die Wahl des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes zur Analyse der entsprechenden Parameter eine Rolle spielt (Kaestner et al., 2005).

### **2.1.2 Caco-2-Zellen**

Caco-2-Zellen sind eine kontinuierliche Zelllinie von heterogenen menschlichen Adenokarzinoma-Epithelzellen. Sie können durch die Art der Kultivierung sowohl als individuelle Zellen, als auch als Monolayer genutzt werden. Im Monolayer bilden Caco-2-Zellen unter anderem tight junctions und Mikrovilli aus und werden oftmals als in vitro-Modell der menschlichen Darmschleimhaut zur Untersuchung der Absorption von Medikamenten eingesetzt (Bock et al., 1998; Steimer et al., 2005). In den vorliegenden Versuchen wurden Caco-2-Zellen als Vergleichsmodell (für Krebszellen) genutzt. Neben einer, im Gegensatz zu

Erythrozyten, normalen Zell-Kompartimentierung zeigen sie auch verschiedene Mechanismen der zellulären Aufnahme von Substanzen und Nanopartikeln.

### **2.2 Biologische Membranen**

#### **2.2.1 Membranaufbau**

Biologische Membranen haben in einem Organismus oder einer Zelle die Funktion der Abgrenzung von einzelnen Kompartimenten. Sie trennen das Innere der Zelle (Cytoplasma) vom umgebenden Zellaußenraum oder benachbarten Zellen ab, beziehungsweise innerhalb der Zelle einzelne Organellen vom Cytoplasma. Darüber hinaus spielen Membranen beziehungsweise darin beinhaltete Proteine eine aktive Rolle beim Transport von Molekülen im Organismus.

Eine biologische Membran ist aufgebaut aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Das Verhältnis der Masse der einzelnen Bestandteile ist abhängig von der Funktion der Membran und kann sich stark unterscheiden. So besteht die Membran von Erythrozyten, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, zu 41% aus Lipiden, zu 52% aus Proteinen und zu 7% aus Kohlenhydraten, welche durch nichtkovalente Kräfte zusammengehalten werden (Deuticke, 2003; Haest 2003).

1972 wurde von Singer und Nicolson das Fluid-Mosaik-Modell zur Beschreibung des Aufbaus einer biologischen Membran entwickelt. So kann man die Doppellipidschicht (bilayer) als eine zweidimensionale flüssig-kristalline Struktur aus Lipiden und Proteinen betrachten. In den folgenden Jahren wurden mehrere Erweiterungen des Modells veröffentlicht. So sind nicht alle Lipide in einem flüssig-kristallinen Zustand in der Membran anzutreffen, sondern einige Lipide sind aufgrund ihrer Phasenübergangstemperatur, welche höher ist als die Umgebungstemperatur in der Membran, in einem kristallinen Zustand. Diese

Phasenübergangstemperatur ergibt sich aus der Struktur der Lipide (Länge der Fettsäuren, Zahl der Doppelbindungen) (Rawicz et al., 2000). Aus diesem Grund bilden sich Domänen von flüssig-kristallinem und kristallinem Zustand aus. Ebenso lässt sich die Flexibilität der Membran durch die Zahl der Cholesterol-Moleküle beeinflussen. Zusätzlich können sich neben der Bilayer-Struktur in Membranen auch vereinzelt Bereiche von Nicht-Bilayer-Strukturen befinden (Cullis und de Kruijff, 1979). Weitere Spezialformen in der Membran sind sogenannte *Lipid Rafts* (Simons und van Meer, 1988), welche aus cholesterinreichen, Glyco- und Sphingolipidhaltigen Mikrodomänen bestehen. Eine Funktion der Lipid Rafts ist die Minimierung der Oberflächenenergie an den Grenzflächen von Proteinen und Lipiden und die Zusammenlagerung von Proteinen zur Signaltransduktion (Allen, 2007).

### 2.2.2 Membranlipide

Die Gemeinsamkeit von membranbildenden Lipiden ist ihre Amphiphilität. Sie besitzen sowohl einen polaren, hydrophilen als auch einen apolaren, hydrophoben Teil. Die drei wichtigsten Gruppen von Membranlipiden sind Phospholipide, Glycolipide und Steroide (unter anderem Cholesterol).

Phospholipide lassen sich wiederum in Glycerin- (Phosphoglyceride) und Sphingosin-haltige Lipide (Sphingolipide) unterscheiden. Phosphoglyceride bestehen aus einem Glycerinskelett, zwei apolaren Fettsäuren mit 14 bis 24 Kohlenstoff-Atomen (nur geradzahlige Anzahl) und einem polaren Kopf, einem Alkohol, welcher über eine Phosphorylgruppe mit dem Glyceringerüst verbunden ist (Abbildung 1). Die wichtigsten Phosphoglyceride zum Aufbau der Membran von Erythrozyten sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS). Das Grundgerüst der Sphingosin-haltigen Phospholipide beinhaltet im Gegensatz zu den Phosphoglyceriden nur eine Fettsäure. Zusätzlich ist ein Alkohol über eine Phosphorylgruppe mit dem Sphingosin verbunden (Sphingomyelin, Abbildung 1).

Glycolipide sind Derivate des Sphingomyelins. An Stelle des phosphorylierten Alkohols tritt hier ein glycosidisch gebundenes Kohlenhydrat (Abbildung 1). Sie sind auf der Außenseite der Membran zu finden und bilden zusammen mit an Proteine gebundenen Kohlenhydraten die Glycokalyx. Die Glycokalyx von Erythrozyten hat verschiedene Funktionen. Durch die Codierung eines Teils der Oberflächenantigene ist die verantwortlich für die verschiedenen Blutgruppen. Zusätzlich lädt sie die Oberfläche des Erythrozyten negativ, wodurch die Zellen sich untereinander abstoßen und nicht aggregieren.

Cholesterol ist ein Sterol und dient im menschlichen Organismus verschiedenen Funktionen, unter anderem auch als Vorstufe bei der Bildung von Steroidhormonen. In der Zellmembran erhöht Cholesterol die Flexibilität und Stabilität der Membran. Chemisch ist es ein polyzyklischer Alkohol.

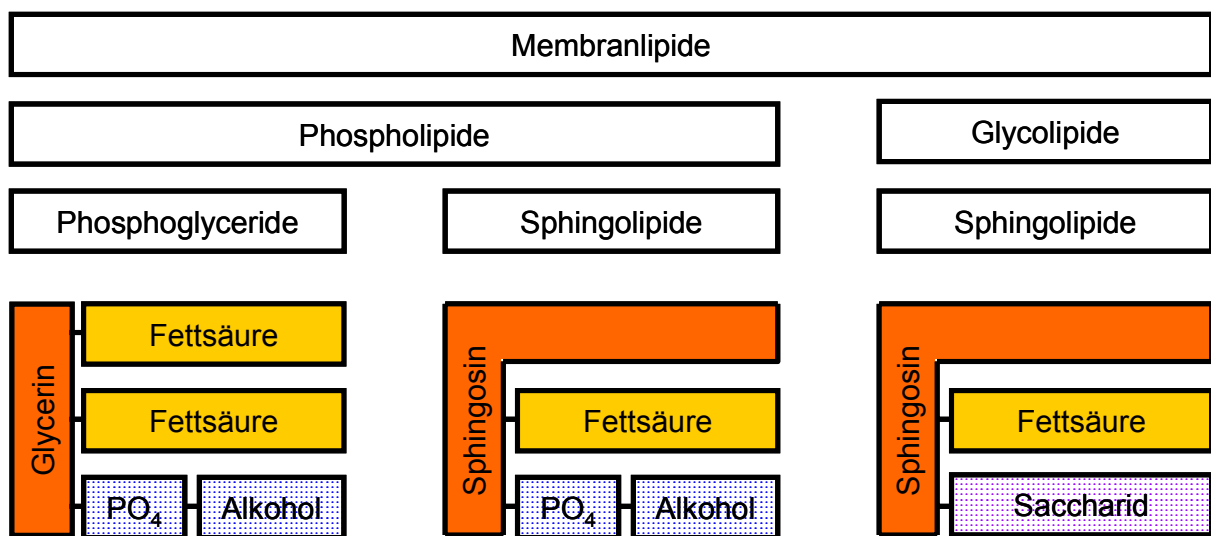


Abbildung 1: Übersicht über verschiedene Membranlipide.

Die verschiedenen Lipide formen in wässriger Umgebung eine sogenannte Bilayer-Struktur aufgrund ihres amphiphilen Charakters (Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson). Die hydrophilen Köpfe der Lipide orientieren sich in der Grenzfläche zum Medium, während die apolaren Fettsäure-Schwänze sich in der Mitte der Lipid-Doppelschicht anordnen und so eine hydrophobe Lage bilden.

Innerhalb der biologischen Membran sind die Lipide nicht gleichmäßig verteilt. So bestehen die innere und äußere Schicht der Membran aus verschiedenen Anteilen der einzelnen Lipide (transversales Ungleichgewicht) (Bretscher, 1972; Bretscher, 1973). Tabelle 1 und Abbildung 2 zeigt die prozentuale Zusammensetzung der jeweiligen Membranschicht von Erythrozyten (van Dijck et al., 1976). Zusätzlich ist die Verteilung der Lipide innerhalb der einzelnen Membranschichten nicht homogen und zufällig verteilt (laterales Ungleichgewicht).

Tabelle 1: Prozentuale Lipidverteilung in der Membran von Erythrozyten (nach van Dijck et al., 1976).

Lipid	Innen	Außen
Phosphatidylcholin (PC)	14	44
Phosphatidylethanolamin (PE)	48	12
Phosphatidylserin (PS)	22	0
Sphingomyelin (SM)	10	44

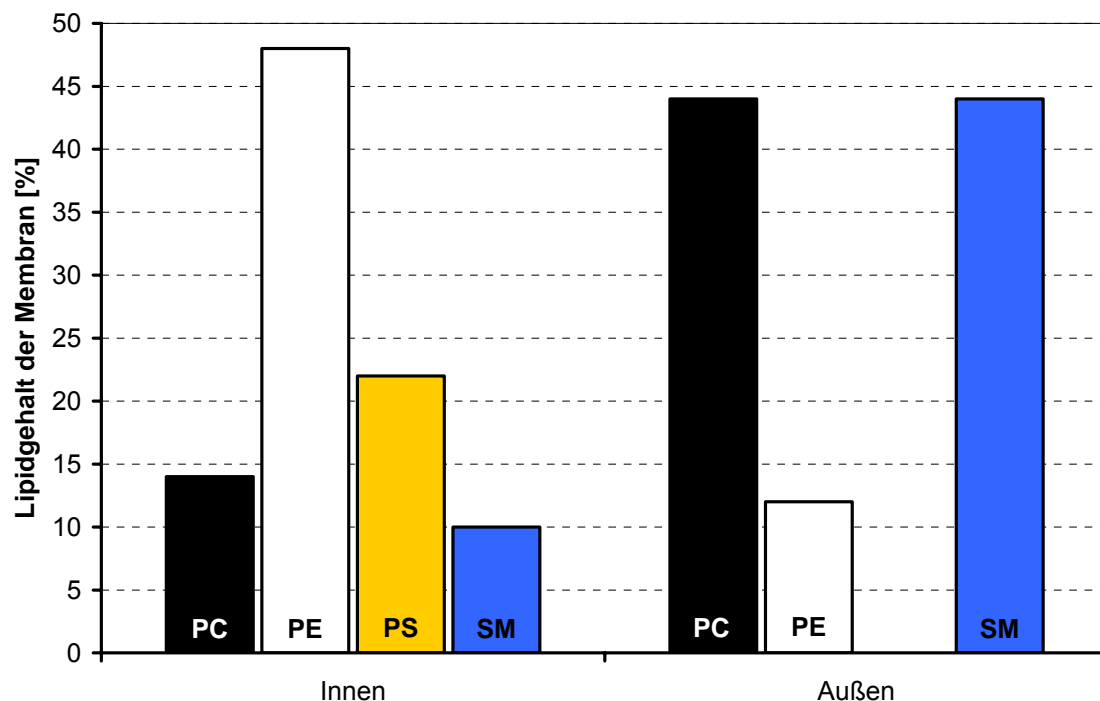


Abbildung 2: Verteilung von Lipiden in der Membran von Erythrozyten (nach van Dijck et al., 1976).



### 2.3 Membranproteine

Bis zu einem Viertel (Carpenter, 2008) aller Proteine im menschlichen Körper sind in der Membran von Zellen aufzufinden. Man kann aufgrund des flüssig-kristallinen Charakters der Lipide die Membran als eine Struktur ansehen, welche als Lösungsmittel für Proteine fungiert. Membranproteine können in zwei Formen in der Membran auftreten: eingelagert in die Membran (integrales Membranprotein) oder über Wasserstoffbindungen oder elektrostatische Interaktionen angelagert an diese (peripheres Membranprotein). Eine weitere Möglichkeit ist die Verankerung in der Membran durch einen kovalent gebundenen Lipidrest. Membranproteine übernehmen essentielle Aufgaben für die Sicherstellung vielfältiger Funktionen in der Membran, unter anderem bei der Signalübertragung, der Zell-Zell-Interaktion, der Verankerung der Zellmembran am Cytoskelett und der extrazellulären Matrix, der Enzymaktivität oder dem Transport von verschiedenen Substanzen wie Ionen, Proteinen und anderen Molekülen. Defekte Transportproteine spielen darüber hinaus bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine wichtige Rolle.

In der Membran von humanen Erythrozyten sind 15 Hauptproteine zu finden. 60 % (w/w) dieser Proteine fallen dabei drei Proteinen zu,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin, Glykophorin und das Bande-3-Protein (benannt nach der Lage der Bande in der Gelelektrophorese). Die charakteristische Form des Erythrozyten wird vom Spektrin-Aktin-Zytoskelett gebildet, welches unter der Zellmembran liegt und mit dieser durch die beiden periphären Membranproteine Ankyrin und Bande-4.1-Protein verbunden ist.

#### 2.2.4 Ionentransport

Aufgrund ihres amphiphilen Charakters sind biologische Membranen nur wenig permeabel für Ionen und geladene Moleküle. Große ungeladene Moleküle wie Zucker können die Membran nicht durchdringen, während kleine Moleküle wie

Wasser oder gelöste Gase ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) sie frei passieren können. Aus diesem Grund benötigt eine Zelle eine Fülle an verschiedenen Transportmechanismen, mit deren Hilfe alle wichtigen Moleküle, die zum Metabolismus der Zelle benötigt werden, die Zellmembran passieren können. Transportmechanismen durch biologische Membranen lassen sich abhängig von ihrer Funktionsweise in drei Klassen einteilen, Pumpen, Carrier und Ionenkanäle (Bernhardt und Ellory, 2003).

### **Pumpen**

Adenosintriphosphatasen (ATPasen) sind Proteine, die die Energie aus der Umwandlung von ATP zu ADP unter Phosphat-Abspaltung nutzen, um eine andere Reaktion zu katalysieren (aktiver Transport, da Energieverbrauch). Membranständige ATPasen nutzen diese Energie, um Teilchen (Ionen, Moleküle) von der einen Seite der Membran zur anderen zu schleusen. ATPasen lassen sich in drei Typen unterteilen: P-Typ, F-Typ, V-Typ.

P-Typ-ATPasen hydrolysieren ATP und bilden mit der gewonnenen Energie einen Ionengradienten aus. Die Stärke des Ionengradienten, den die ATPasen ausbilden, variiert. Während die  $Na^+/K^+$ -ATPasen einen zehnfachen Gradienten ausbildet, zeigt sich bei der  $H^+/K^+$ -ATPasen ein Gradient von einer Million. Die Inhibierung der  $Na^+/K^+$ -ATPase ist durch Ouabain möglich. Für die  $Ca^{2+}$ -ATPase ist kein spezifischer Inhibitor bekannt, ATPasen des P-Typs lassen sich aber generell durch Ortho-Vanadat ( $[VO_4]^{3-}$ ) blockieren.

F-Typ-ATPasen können mithilfe eines Protonengradienten ATP aus ADP synthetisieren (ATP-Synthasen). Sie sind bei Eukaryoten in der Membran von Mitochondrien zu finden.

V-Typ-ATPasen sind strukturell mit den F-Typ-ATPasen verwandt. Sie bauen unter ATP-Hydrolyse einen Protonengradienten auf und sind in der Membran von Vakuolen von Prokaryoten und in Vesikeln der Exo- und Endozytose zu finden. Ihre Hauptfunktion besteht in der Regulierung des pH-Wertes in den Versikeln.

ABC-Transporter stellen eine Sonderform der aktiven Transporter dar. Sie besitzen als gemeinsames Element eine ATP-bindende Kasette (englisch ATP binding cassette, ABC) und transportieren unter ATP-Hydrolyse eine oder mehrere spezifische Substanzen entgegen ihrem Konzentrationsgradienten. Zu finden sind ABC-Transporter in den meisten sezernierenden Geweben, wie im Darm oder in der Leber. Bei Eukaryoten sind alle ABC-Transporter ausschließlich Exporter. Strukturell zu den ABC-Transportern werden einige Ionenkanäle dazu gezählt, die zwar keinen aktiven Transport realisieren, aber durch ATP reguliert werden.

### **Carrier**

Carrier sind eine zweite Klasse von Transportproteinen in biologischen Membranen. Sie können entweder als Uniporter oder als Cotransporter (Symporter beziehungsweise Antiporter) auftreten. Uniporter transportieren durch eine Konformationsänderung ein Ion entlang seines elektrochemischen Gradienten von der einen Seite der Membran zur anderen Seite (erleichterte Diffusion), während Cotransporter den Transport des einen Ions entlang seines Gradienten nutzen, um einen zweiten Transportprozess einer anderen Ionenart entgegen eines Gradienten durchzuführen. Im Fall des Symporters werden beide Ionen in die gleiche Richtung transportiert, beim Antiporter erfolgt der Transport in entgegengesetzte Richtung. Carrier verbrauchen im Gegensatz zu den aktiven Transportern kein ATP, werden aber oft als sekundärer aktiver Transport bezeichnet. ATP-abhängige Pumpen bilden oftmals den von den Carriern genutzten Gradienten aus.

### **Kanäle**

Kanal- oder porenbildende Proteine dienen der schnellen Diffusion von Ionen oder Molekülen durch biologische Membranen (passiver Transport). Alle Kanäle haben zwei Gemeinsamkeiten: sie besitzen einen Selektivitätsfilter für bestimmte Ionen oder Moleküle und einen Regulationsmechanismus für das Öffnen und Schließen des Kanals. Die Regulation des Kanals kann durch verschiedene

Mechanismen erfolgen, wie durch die elektrische Potenzialdifferenz, spezifische Substanzen, mechanischen Stress (Zellvolumen, Druck) oder durch Licht.

Blockiert man alle bekannten Transportmechanismen (Pumpen, Carrier, Kanäle), ist durch die Membran immer noch ein Rest an Transport zu beobachten. Dieser Rest-Flux ist weitestgehend unerforscht und lässt sich durch verschiedene Möglichkeiten erklären. Lipid-Störstellen (wie Nichtbilayer-Strukturen oder Domänenbildung in der Membran (zum Beispiel Lipid Rafts)), die Grenzphase von Proteinen und Lipiden oder Lücken beziehungsweise "Kanäle" zwischen Proteinuntereinheiten können eine mögliche Ursache sein. Zusätzlich müssen bisher noch nicht erforschte Transportmechanismen der anderen drei Klassen zum Rest-Transport gezählt werden.

Abbildung 3 zeigt die verschiedenen bekannten Transportmechanismen für  $K^+$  und  $Na^+$  des menschlichen Erythrozyten (Bernhardt und Weiss, 2003). Sie offenbart deutlich die Vielfalt an Transportmechanismen und die Tatsache, dass ein bestimmtes Ion von einer großen Menge an verschiedenen Systemen transportiert werden kann.

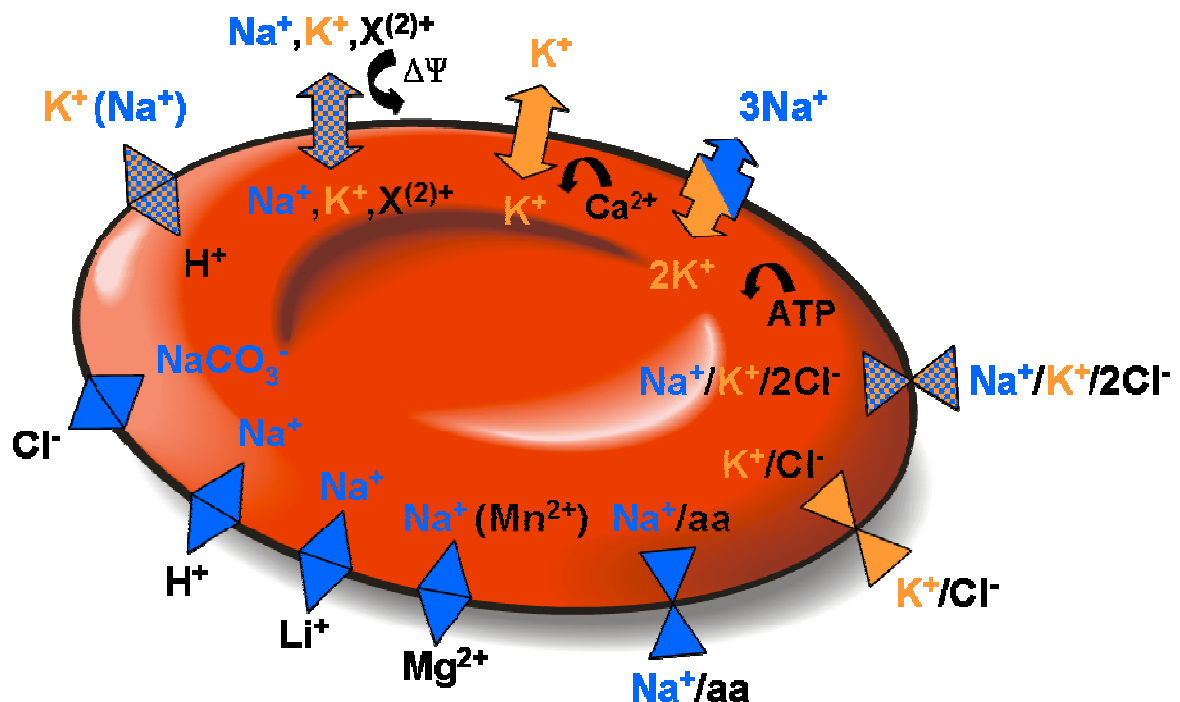


Abbildung 3: Transportmechanismen des menschlichen Erythrozyten für  $K^+$  und  $Na^+$ . Aufgezeigte Transportmechanismen:  $Na^+/K^+$ -Pumpe,  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Symporter,  $K^+/Cl^-$ -Symporter,  $Na^+$ -abhängiger Aminosäuren-Transporter,  $NaCO_3^-/Cl^-$ -Austauscher,  $Na^+(Mn^{2+})/Mg^{2+}$ -Antiporter,  $Na^+/Li^+$ -Antiporter,  $Na^+/H^+$ -Antiporter, nicht-selektiver, spannungsabhängiger Kationenkanal-Kanal (NSVDC-Kanal),  $K^+(Na^+)/H^+$ -Antiporter und  $Ca^{2+}$ -aktivierter  $K^+$ -Kanal (Gárdos-Kanal) (nach Bernhardt und Weiss, 2003).

### 2.2.5 Bewegung von Membrankomponenten

Wie im Fluid-Mosaik-Modell postuliert, sind Phospholipide und Proteine nicht fest in einem Gitter gebunden, sondern können sich in der Membran bewegen. Die Proteine sind in die Membranlipide eingebettet. An der Bewegung der einzelnen Membrankomponenten sind verschiedene Mechanismen und spezialisierte Proteine beteiligt. In der lateralen Bewegung sind die Membranlipide und Proteine frei, sie können sich durch Diffusion auf der jeweiligen Seite der Membran bewegen. Membranlipide können zusätzlich um die C-C-Bindungen ihrer

Fettsäuren rotieren. Die transversale Bewegung (sogenannter Flip-Flop) kann im Gegensatz dazu von Proteinen nicht vollzogen werden. Selbst bei Lipiden ist diese Art der Bewegung in der Membran ohne Zuhilfenahme von Proteinen sehr langsam (Zeiten für die Bewegung von Membrankomponenten siehe Tabelle 2). Eine gerichtete Translokation wird zum Teil durch Enzyme beschleunigt, welche die asymmetrische Distribution der Lipide in der Membran aufrechterhalten. Wichtige dieser Proteine sind die Flippase und die Scramblase (siehe Abschnitt 2.6.3) (Bretscher, 1972).

Tabelle 2: Geschwindigkeit der Bewegung von Lipiden und Proteinen in der Membran.

	Lipide	Proteine
Rotation	$10^{-10} - 10^{-9}$ s	20 - 500 $\mu$ s
Diffusion	kristallin: $10^{-10}$ cm <sup>2</sup> /s flüssig-kristallin: $10^{-8}$ cm <sup>2</sup> /s	$10^{-8} - 10^{-10}$ cm <sup>2</sup> /s
Flip-Flop	nicht proteinvermittelt: Stunden bis Tage proteinvermittelt: Minuten	keine

### 2.2.6 Zelluläre physiologische Parameter

Transportproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Ionengradienten in Zellen. Unsere Untersuchungen fokussieren sich auf wichtige zelluläre Parameter, welche eine substantielle Rolle im physiologischen Haushalt der Zellen spielen, die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und den pH-Wert. Zusätzlich wurden einige weitere Faktoren wie die Exposition von Phosphatidylserin, das Membranpotenzial und die Zytotoxizität der Nanopartikel untersucht. Nanopartikel und andere Substanzen können mit der Zellmembran und den verschiedenen Transportmechanismen interagieren und eine sogenannte Nanotoxizität induzieren.

### **Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

$\text{Ca}^{2+}$  gilt als ein Nährstoff und spielt eine wichtige Rolle im menschlichen Stoffwechsel. Mit einer Masse von etwa einem Kilogramm ist  $\text{Ca}^{2+}$  das am häufigsten verfügbare Mineral im menschlichen Körper. 99% des  $\text{Ca}^{2+}$  sind in Knochen und Zähnen zu finden.  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  ist verantwortlich für deren Stabilität. Als second messenger löst  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig vom Zelltyp viele verschiedene, wichtige Prozesse aus, wie zum Beispiel die Stimulation von Muskeln und Neuronen, die Aktivierung oder Hemmung von Enzymen und Hormonen, die Zellproliferation und Gentranskription oder die Einleitung der Apoptose (in Erythrozyten Eryptose genannt (Lang et al., 2005)).

Aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten von Faktor 1000 und der geringen Membranpermeabilität ( $P_{\text{Ca}}$ ) kann  $\text{Ca}^{2+}$  als schnell reagierender molekularer Regulator genutzt werden. Im Inneren der Zelle ist die Konzentration etwa 1  $\mu\text{M}$ , außerhalb der Zelle liegt sie bei 1-2 mM. Die freie intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist viel niedriger, da Phospholipide und Proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden können (freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration < 100 nM (Tiffert et al., 2003)) (im weiteren Verlauf wird lediglich Bezug genommen auf die freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration). Aus diesen Gründen entsteht ein passiver Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ . Der aktive Transport der aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe bildet entgegengesetzt zum geringen passiven Influx den Gradienten aus und hält die intrazelluläre Konzentration auf einem sehr niedrigen Level.

In Erythrozyten können erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen durch die Aktivität des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals (Gárdos-Kanal) und/oder des nicht-selektiven, spannungsabhängigen Kationen (nonselective, voltage dependent cation, NSVDC)-Kanals, apoptotische Prozesse und eine Vernetzung von Cytoskelettmolekülen oder die Aktivierung von Proteasen auftreten. Zudem kann eine reduzierte Aktivität oder Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe zu einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt innerhalb der Zelle führen. Stresssituationen oder die Lagerung von

Zellen können ebenso zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen (Tiffert et al., 2003).

Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport spielen insbesondere die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe, der NSVDC-Kanal und der Gárdos-Kanal eine Rolle. Diese sind in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe ist der einzige aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter, welcher  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle herausbefördert. Deren Aktivität resultiert in dem niedrigen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und formt dadurch den elektrochemischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe besitzt eine intrazelluläre ATP-Bindestelle, an welcher das ATP hydrolysiert wird. Die daraus gewonnene Energie wird anschließend von der Pumpe zum Transport der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen benutzt. Bei Blut vom selben Spender ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe nicht immer gleich stark aktiv in den einzelnen Erythrozyten. Dies kann wichtig sein bei der Reaktion der Zellen auf physiologische und pathologische Stimuli (Lew et al., 2003). So scheint es zwei Populationen von Erythrozyten zu geben, welche wie folgt reagieren. Eine Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch ein Ionophor hat zur Folge, dass bei einer Fraktion  $\text{Ca}^{2+}$  nach wenigen Sekunden wieder herausgepumpt wird, während beim Rest die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bis zum Gleichgewicht ansteigt (García-Sancho und Lew, 1988a; García-Sancho und Lew, 1988b; Lew und García-Sancho, 1989). Dies kann für weitere Betrachtungen eine wichtige Rolle spielen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe ist eine multiregulierte Pumpe (Carafoli, 1992; Carafoli, 1997; Wang, 1992), deren Aktivität von diversen intrazellulären Faktoren wie Calpain und Calmodulin beeinflusst werden kann.

Der NSVDC-Kanal ist permeabel für diverse mono- und bivalente Kationen (unter anderem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ ), aber nur geöffnet bei einem positiven Transmembranpotenzial. Bei physiologischen (negativen) Transmembranpotenzialen ist es möglich, den Kanal durch eine Kopplung von Substanzen (Acetylcholin, einem Acetylcholin-Agonisten wie Carbachol oder durch Nicotin) an den nicotinischen Acetylcholinrezeptor zu aktivieren (Bennekou



und Christophersen, 2003). Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), freigesetzt durch aktivierte Thrombozyten, ist ebenso in der Lage, den NSVDC-Kanal zu aktivieren (Kaestner und Bernhardt, 2002). Die Anzahl an Kanälen in der Erythrozytenmembran wird auf etwa 300 geschätzt (Bennekou und Christophersen, 2003).

Die Aktivierung des Gárdos-Kanals (benannt nach dem Entdecker G. Gárdos (1958)) durch einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration resultiert in einem Efflux von K<sup>+</sup>. Da der Efflux von K<sup>+</sup> einhergeht mit einem Austritt von Cl<sup>-</sup> und einem damit verbundenen H<sub>2</sub>O-Verlust, kommt es zu einer Volumenänderung, welche indirekt die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beeinflusst. Die Zahl an Gárdos-Kanälen in der Membran eines Erythrozyten wird auf etwa 100-200 geschätzt (Bennekou und Christophersen, 2003; Gárdos, 1958).

### **Intrazellulärer pH-Wert**

Der pH-Wert dient im Allgemeinen als Maß für die Azidität oder Alkalität einer wässrigen Lösung und berechnet sich als negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an Wasserstoffionen. In der Natur spielt der pH eine wichtige Rolle bei der Haut (als Schutz vor Krankheitserregern) oder der Verfügbarkeit von gelösten Stoffen (Salzen), so zum Beispiel im Boden oder im Körper (Blut, Zellflüssigkeiten). Der pH-Wert von Blut und Erythrozyten ist streng reguliert. Der *physiologische pH-Wert*, der pH-Wert im Blut, ist leicht basisch bei einem Wert von 7,35-7,45 und wird durch den Blutpuffer, ein komplexes System aus Proteinen, Salzen und gelöstem CO<sub>2</sub> geregelt und wirkt unter anderem auf die Aufnahme und Abgabe von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> (Bohr-Effekt).

Der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten liegt etwas niedriger als der pH von Blut, bei 7,2. Es stehen in der Membran von Erythrozyten mehrere Mechanismen zur Verfügung, durch welche der intrazelluläre pH-Wert reguliert wird. Zwei der wichtigsten Transportproteine hierfür sind der Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher (Bande 3-Protein) (Knauf und Pal, 2003; Nikinmaa, 2003) und der Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup>-Austauscher. Veränderungen im intrazellulären pH sind überwiegend die Folge einer

Veränderung in der Aktivität dieser Transporter. Ein veränderter pH-Wert (zum Beispiel durch den Anstieg des pH-Wertes bei Deoxygenierung) hat zur Folge, dass die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe um 18-32% reduziert wird (Tiffert, 1993; Tiffert, 2003).

Das Bande 3-Protein bewerkstelligt den Anionenaustausch und den Cotransport von Anionen und Protonen. Mit einer Million Kopien pro Zelle ist das Bande 3-Protein das am häufigsten vorkommende Protein in der Membran von Erythrozyten (Nikinmaa, 2003) und hat dadurch einen besonderen Einfluss auf die pH-Regulierung. Die Verteilung von Anionen und Protonen lässt sich mit dem Donnan-Gleichgewicht (1) beschreiben.

$$\frac{c(\text{HCO}_3^-)_i}{c(\text{HCO}_3^-)_o} = \frac{c(\text{Cl}^-)_i}{c(\text{Cl}^-)_o} = \frac{c(\text{OH}^-)_i}{c(\text{OH}^-)_o} = \frac{c(\text{H}^+)_o}{c(\text{H}^+)_i} \quad (1)$$

Der Ausgleich des intrazellulären pH-Wertes durch die Zellmembran kann zum einen durch den Transport von Protonen in die eine Richtung als auch den Transport von  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{OH}^-$  in die andere Richtung erfolgen. Der Antiport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}^+$  wird vom  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, NHE) bewerkstelligt. Es sind bisher 9 Isoformen bekannt, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich präsent sind. Einige dieser Isoformen transportieren zusätzlich auch noch  $\text{K}^+$ . Eine weitere Aufgabe neben der Regulierung des pH ist die damit verbundene Regulierung des Volumens von Zellen (Bernhardt et al., 2001; Bernhardt und Weiss, 2003). An der Membran humaner Erythrozyten ist die erste Isoform, der NHE1, präsent. Darüber hinaus wird die Existenz weiterer Isoformen vermutet. Vermutlich ist der NHE7 auch vorhanden (Lang, 2012). Der  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, welcher bisher beim Aalmolch (*Amphiuma*) und der Forelle (*Salmo gairdneri*) nachgewiesen werden konnte (Cala, 1980; Cala, 1983; Maldonado, 1992; Fievet, 1993), übernimmt ähnliche Funktionen wie der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher.

## PS-Exposition

Das Absterben von Zellen lässt sich in zwei grundlegende Abläufe unterteilen. Während es bei der Nekrose zur Zerstörung der Zelle inklusive dem Freisetzen von Substanzen in die Zellumgebung und der damit verbundenen Schädigung von benachbarten Zellen kommen kann, kann eine Zelle ihren eigenen Zelltod selbst aktiv durch das Einleiten der Apoptose (in Erythrozyten Eryptose genannt) durchführen, um die Zelle unter Kontrolle und ohne Schädigung der Umgebung abzubauen. Aus diesem Grund spricht man bei der Apoptose vom programmierten Zelltod. Wird vom Erythrozyten die Eryptose eingeleitet, kommt es neben vielfältigen Mechanismen unter anderem zu einem Zusammenbruch der Asymmetrie der Lipidverteilung in der Erythrozytenmembran. Da in der gesunden Zelle PS ausschließlich auf der Innenseite der Membran zu finden ist (vergleiche Tabelle 1), ist das Auffinden von PS auf der Außenseite der Membran ein Marker für die eingeleitete Eryptose. PS dient hier als Signal für die Erkennung der Erythrozyten durch Makrophagen (Verhoeven et al., 1995).

Die Translokation von negativ geladenen Phospholipiden (vor allem PS, PE) zwischen der inneren und der äußeren Schicht der Zellmembran wird Phospholipid-*Scrambling* genannt. Verantwortlich für die Translokation ist ein spezialisiertes Enzym in der Zellmembran. Dieses ist im physiologischen Zustand der Zelle inaktiv und wird bei der Eryptose über eine Signalkaskade aktiviert. Die Aktivierung kann durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel eine Erhöhung der Konzentration an intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ , erfolgen. Hierfür besitzt das Enzym ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Motiv. Zusätzlich kann eine Nitrosylierung oder Oxidation (zum Beispiel durch oxidativen Stress) zu einer Veränderung der Aktivität der Scramblase führen.

Anmerkung: Das Enzym, welches Phospholipid-*Scrambling* durchführt, ist nach aktuellem Forschungsstand wahrscheinlich nicht identisch mit der in der Literatur benannten Phospholipid-Scramblase. In der Arbeit wird jedoch im Folgenden der

Einfachheit halber das tatsächlich scrambelnde Enzym als Scramblase bezeichnet (Sims und Wiedmer, 2001).

### Transmembranpotenzial

Das (Trans-)Membranpotenzial einer Zelle ergibt sich aus der Spannungsdifferenz, die zwischen der Innen- und Außenseite einer Membran anliegt. Dieses Potenzial entsteht durch die unterschiedliche Konzentration von Ionen auf den beiden Seiten und der Permeabilität der Membran für diese einzelnen Ionen. Diese beiden Faktoren (Konzentrationen und Permeabilität) gehen ein in die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (2), mit deren Hilfe man das Membranpotenzial  $\Delta\Psi$  von Zellen berechnen kann:

$$\Delta\Psi = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na} \cdot [Na^+]_a + P_K \cdot [K^+]_a + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_{Na} \cdot [Na^+]_i + P_K \cdot [K^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_a} \quad (2)$$

$R$  = Universelle Gaskonstante,  $T$  = absolute Temperatur,  $F$  = Faraday-Konstante,  $P$  = Permeabilität

Eine Veränderung im Membranpotenzial von Erythrozyten hat für den Ionenhaushalt einer Zelle große Bedeutung. So kann zum Beispiel wie beim NSVDC-Kanal, die Aktivität von Transportsystemen potenzialabhängig sein.

An der Ausbildung des Membranpotenzials von Erythrozyten ist das Bande 3-Protein maßgeblich beteiligt. Es stellt ein Gleichgewicht zwischen dem Protonengradienten und dem  $Cl^-$ -Gradienten her (Harris und Mainzels, 1952; Wieth et al., 1980). Kationenkonzentrationen können auf beiden Seiten der Zellmembran als konstant angesehen werden, da die Membran für diese im Vergleich zu den  $Cl^-$ -Ionen verhältnismäßig undurchlässig ist. Das Gleichgewicht, welches sich durch die Verteilung von  $Cl^-$  unter physiologischen Bedingungen einstellt, ist maßgeblich zur Bildung des Membranpotenzials verantwortlich. Das Nernst-Potenzial für  $Cl^-$  lässt sich für das Transmembranpotenzial anwenden,

was bei Erythrozyten zu einem Wert von cirka -10 mV führt (Hoffman und Larris, 1974; Kummerow et al., 2000).

### **2.2.7 Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen**

Die Aufnahme von Substanzen in Zellen kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Neben den in 2.4 bereits vorgestellten Transportwegen für kleine Moleküle und Ionen können größere oder ungeladene Moleküle durch die Membran durch eine Reihe anderer Mechanismen in das Innere einer Zelle gelangen. Diese werden im Allgemeinen unter dem Oberbegriff Endozytose zusammengefasst. Endozytose bezeichnet eine Einstülpung der Membran um eine aufzunehmende Substanz. Anschließend kommt es zur Abschnürung eines Vesikels in das Zellinnere und der Prozessierung dieses Vesikels im Endosom.

Man unterscheidet verschiedene Formen der Endozytose. Große Partikel können mittels Phagozytose aufgenommen werden, einem Mechanismus, bei welchem durch Aktin-Umstrukturierungen die Zellmembran um die Partikel bewegt wird. Vorrangig tritt dieser Mechanismus in darauf spezialisierten Zellen (zum Beispiel Makrophagen, Monocyten, dendritische Zellen) auf, jedoch können auch Epithel- und Endothelzellen Phagozytose zeigen. Zusätzlich zeigen alle Zelltypen (mit Ausnahme von Erythrozyten) weitere endozytotische Aktivität. Neben einer rezeptorunabhängigen Aufnahme ohne zusätzliche Hüllproteine (dem sogenannten Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Mechanismus) gibt es noch zwei rezeptorvermittelte endozytotische Mechanismen, die Clathrin- und die Caveolin-unterstützte Aufnahme (Rabinovitch, 1995; Conner und Schmid, 2003; Hillaireau und Couvreur, 2009). Nach der Bindung der Substanz an einen Rezeptor stülpt sich die Membran ein und bildet eine mit Clathrin beziehungsweise Caveolin umhüllte Grube, welche sich ins Zellinnere abkapselt. Diese verschiedenen Endozytose-Mechanismen können mittels spezifischer Substanzen inhibiert werden, so dass gezielt einzelne Mechanismen zur Untersuchung des jeweiligen Aufnahmewegs blockiert werden können. Hierbei

sollte bemerkt werden, dass Erythrozyten im Gegensatz zu anderen Zelltypen (wie Caco-2-Zellen) keine Endozytose zeigen und eine Internalisierung von Nanopartikeln nur passiv bewerkstelligt werden kann. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Mechanismen.

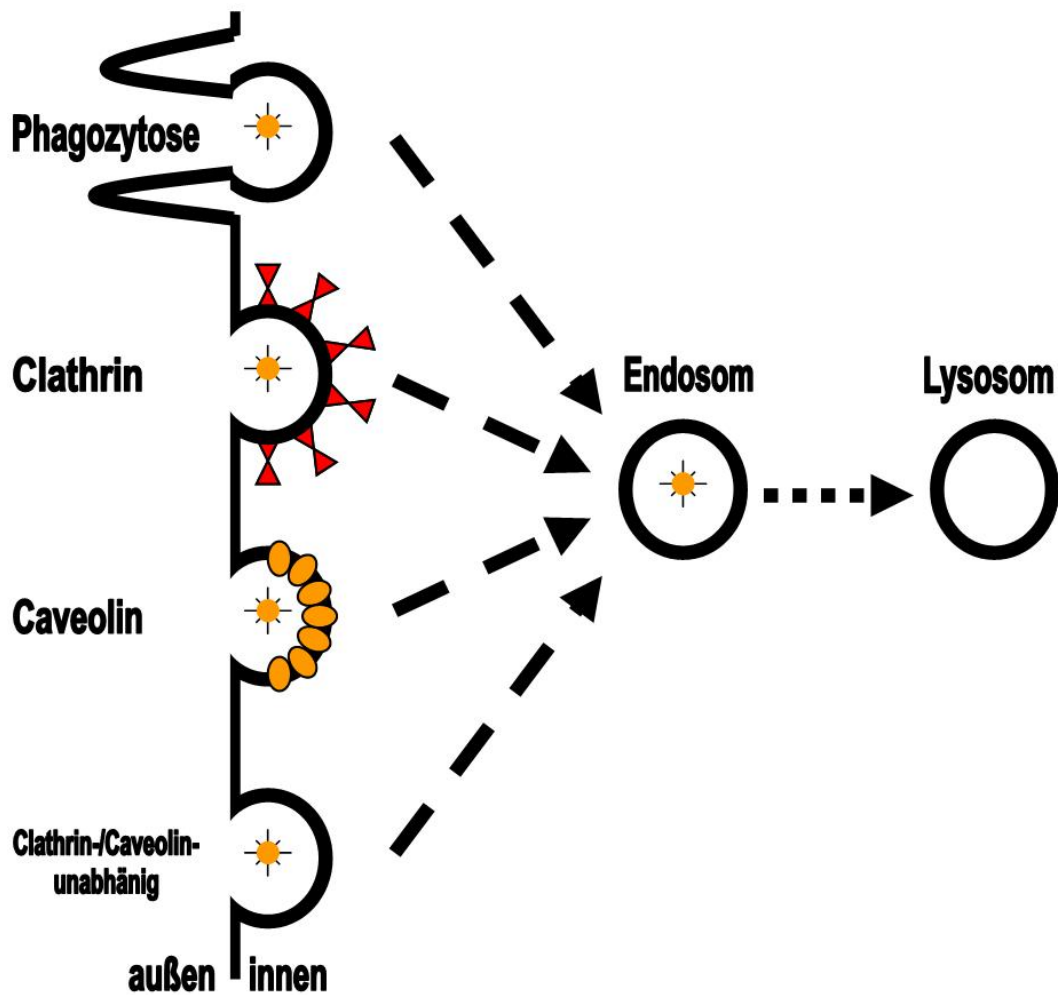


Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Aufnahmemechanismen in biologischen Zellen, rot: Clathrin, orange: Caveolin (nach Neumeyer, 2010).

### 2.3 Fluoreszenz

Fluoreszenz beschreibt die Eigenschaft von Substanzen, elektromagnetische Strahlung (wie zum Beispiel Photonen) zu absorbieren und einen Teil der absorbierten Energie wieder abzugeben.

Die Energie eines Photons setzt sich zusammen aus der Wellenlänge des Lichts und dem Planckschen Wirkungsquantum (3):

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (3)$$

$E$  = Energie des Photons,  $h$  = Plancksches Wirkungsquantum,  $\nu$  = Frequenz des Lichts,  $c$  = Geschwindigkeit des Lichts im Vakuum,  $\lambda$  = Wellenlänge des Lichts

Atome und Moleküle besitzen Elektronen, welche sich abhängig vom jeweiligen Element auf charakteristischen spezifischen Energieniveaus befinden. Setzt man einen fluoreszierenden Stoff nun einem Licht der Wellenlänge  $\lambda$  aus, so wird die Energie der Photonen absorbiert. Bei der Wechselwirkung zwischen den Photonen und der Materie wird die Energie der Photonen dazu genutzt, Elektronen von ihrem energetischen Grundzustand ( $S_0$ ) auf einen höheren, angeregten Energiezustand ( $S_1'$ ) anzuheben. Die Energie der absorbierten Photonen ( $E$ ) muss der Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand entsprechen (4):

$$E = \Delta E = E_{S_1'} - E_{S_0} \quad (4)$$

Durch Relaxationszustände fällt das angeregte Elektron ohne die Abgabe von Photonen (strahlungslose Relaxation) auf das tiefste angeregte Energieniveau ( $S_1$ ) ab. Anschließend fällt es weiter auf den Grundzustand ( $S_0$ ) unter Abgabe von Photonen. Diese Photonen sind die charakteristische Fluoreszenzstrahlung der Substanz. Ihre Wellenlänge ( $E_{flu}$ ) entspricht der Differenz der beiden Energieniveaus  $S_1$  und  $S_0$  (5).

$$E_{fluor} = \Delta E_{fluor} = E_{S_1} - E_{S_0} \quad (5)$$

Im vereinfacht dargestellten Jablonski-Diagramm (Abbildung 5) sind die einzelnen Energieübergänge schematisch aufgezeigt. Die Differenz aus der Energie der absorbierten Photonen ( $E$ ) und der emittierten Photonen ( $E_{fluor}$ ) entspricht dem strahlungslosen Energieverlust durch Relaxation. Die Verschiebung der Wellenlänge des Anregungsphotons hin zur höheren Wellenlänge des energieärmeren Emissionsphotons zeigt sich in den charakteristischen Wellenlängen von Anregung und Emission von Fluoreszenzfarbstoffen (Stokes Shift).

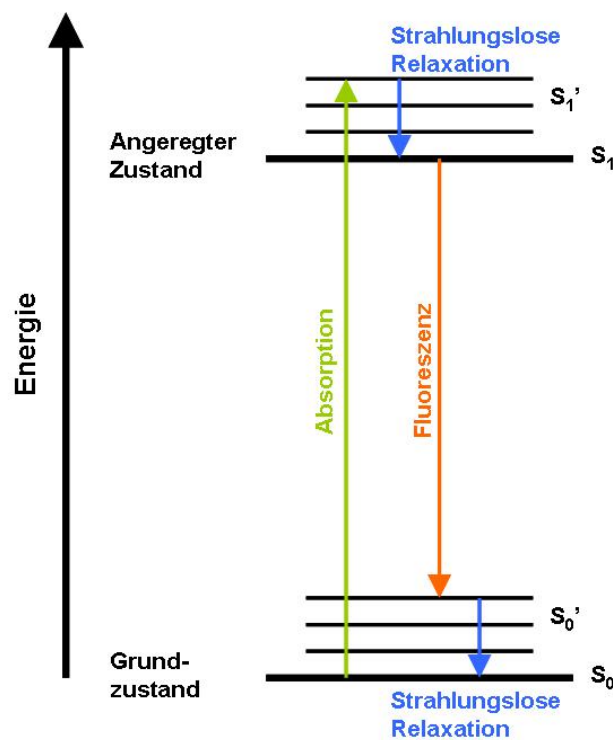


Abbildung 5: Jablonski-Diagramm.



## Multiphotonenmikroskopie

Die Multiphotonenmikroskopie ist eine Spezialtechnik zur Bilderzeugung. Während bei der konventionellen Fluoreszenz ein Elektron durch ein einzelnes Photon angeregt wird, wird die Anregung bei der Multiphotonenmikroskopie durch mehrere gleichzeitig (innerhalb einer Attosekunde ( $10^{-18}$  s)) eintreffende Photonen hervorgerufen. Diese Photonen besitzen in der Summe dieselbe Energie wie das Photon bei der klassischen Fluoreszenzanregung. Da die Energie der einzelnen Photonen im Verhältnis geringer ist als die Energie des einzelnen Photons, ist die Wellenlänge um denselben Faktor erhöht. Abbildung 6 zeigt als Beispiel die Zwei- und Drei-Photonen-Fluoreszenzanregung im Vergleich zur klassischen Anregung. Die Anregungswellenlänge beträgt bei der Zwei-Photonen-Anregung das Doppelte (im Beispiel 720 nm), bei der Drei-Photonen-Anregung das Dreifache (1080 nm) der normalen Anregungswellenlänge (360 nm). Die Autofluoreszenz von Hämoglobin überlagert bei Untersuchungen in Erythrozyten die Anregungswellenlänge des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff fura-2 AM. Um den Farbstoff effektiv einzusetzen, muss hier in der Regel die Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden (Kaestner et al., 2005).

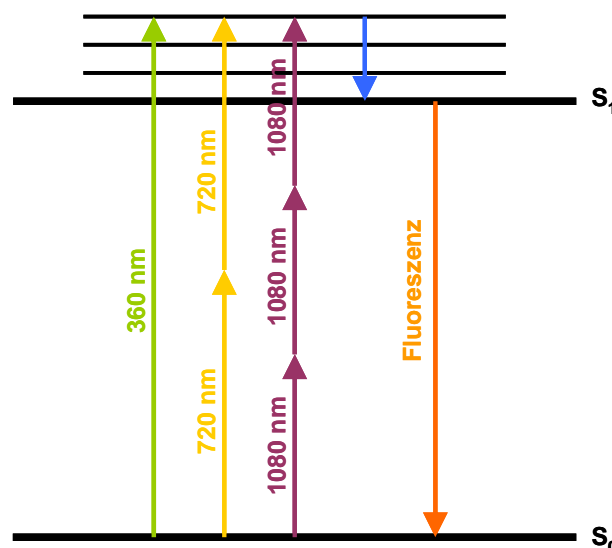


Abbildung 6: Zwei- und Drei-Photonen-Fluoreszenzanregung (gelb beziehungsweise rot) im Vergleich zur klassischen Anregung (grün) am Beispiel von fura-2.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Geräte

##### 3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Folgende Chemikalien wurden in der Arbeit verwendet:

Anorganische Salze (NaCl, CaCl <sub>2</sub> ,KCl)	Sigma-Aldrich / Roth / VWR
BaySilone	Bayer
Chlorpromazine	Sigma-Aldrich
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfonyloxid (DMSO)	Roth
Drabkins-Reagenz	Sigma-Aldrich
HEPES	Roth
Ethylendiamintetraacetat-Na (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycoltetraacetat-Na (EGTA)	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich / Roth
Lactatdehydrogenase	Fluka
NAD <sup>+</sup>	Sigma-Aldrich
NaOH	Roth
<i>N</i> -Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich
Nystatin	Sigma-Aldrich
Patent blue V Na-Salz	Sigma-Aldrich
Pluronic F-127, 20 % in DMSO	Molecular Probes
Poly-L-Lysin, 0,1 % in H <sub>2</sub> O	Roth
Pyruvat	Sigma-Aldrich
SQI-Pr	Sigma-Aldrich
Valinomycin	Sigma-Aldrich
XTT-Assay	Roche

Fluoreszenzfarbstoffe

invitrogen

fluo-4 AM

fura-2 AM

Bis-(1,3-dibutylbarbiturat)trimethinoxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3))

2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF AM)

Annexin V-FITC

Die verwendeten Lösungen haben nachstehende Zusammensetzung:

Physiologische Lösung

NaCl 145 mM

KCl 7,5 mM

Glucose 10 mM

HEPES 10 mM

pH bei Raumtemperatur (eingestellt mit Tris/NaOH) 7,4

Lösungen mit niedriger Ionenstärke (LIS, low ionic strength)

LIS200

Saccharose 200 mM

KCl 7,5 mM

Glucose 10 mM

HEPES 10 mM

pH bei Raumtemperatur (eingestellt mit Tris/NaOH) 7,4

LIS250

Saccharose 250 mM

KCl 7,5 mM

Glucose 10 mM

HEPES 10 mM

pH bei Raumtemperatur (eingestellt mit Tris/NaOH) 7,4

#### BCECF-Kalibrierlösung

KCl 135 mM

NaCl 10 mM

Glucose 10 mM

HEPES 10 mM

pH bei Raumtemperatur (eingestellt mit Tris/NaOH) 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6

#### Farbstoff-Stammlösungen

Die Acetoxymethyl-Ester der Farbstoffe BCECF (BCECF-AM), fluo-4 (fluo-4-AM) und fura-2 (fura-2 AM) (je 50 µg) wurden in je 50 µl Pluronic F-127 gelöst und bis zum Gebrauch im Dunkeln bei -20°C gelagert. Die Stammlösungen haben eine Konzentration von 800 µM für BCECF und 1 M für fluo-4 AM.

25 mg DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden mit 1,9 ml DMSO zu einer Stammlösung von 25 mM angesetzt. Von dieser Stammlösung wurde täglich eine 250 nM konzentrierte Verdünnung mit physiologischer Lösung (beziehungsweise LIS200/LIS250) frisch hergestellt.

#### 3.1.2 Geräte

Nachfolgend stehende Großgeräte wurden während der Promotion eingesetzt.

Zur Untersuchung von intrazellulärem pH-Wert und intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und dem Beobachten von Formveränderungen wurden verschiedene Mikroskope eingesetzt. Das Modell Eclipse TE2000-E (Nikon) ist ein inverses Fluoreszenzmikroskop, kombiniert mit dem Polychromator-System VisiChrome High Speed (Visitron System) einer hochauflösenden CCD-Kamera Cascade 512B (Photometrics) und wird zentral mit der Software Metavue (Visitron System) gesteuert. Als zweites inverses Fluoreszenzmikroskop wurde das Modell IX50 (Olympus) mit einem Polychromator Polychrome II (Till

Photonics) und dem Kamera- und Softwaresystem IMAGO (Till Photonics) genutzt.

Das Konfokale Laser Scanning Mikroskop LSM400 (Zeiss) wurde bevorzugt eingesetzt, um den Ort der Fluoreszenz genauer bestimmen zu können. Dies wurde überwiegend bei der Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Untersuchung der PU-Fasern genutzt. Daneben wurden die Analysen der verschiedenen fluoreszenten Nanopartikel mit dem LSM400 durchgeführt.

Das Durchflusszytometer-System FACScalibur, Becton-Dickinson wurde eingesetzt, wenn große Mengen an Zellen auf ihre Fluoreszenz zu überprüfen waren, vorrangig bei der Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und den Untersuchungen zum Membranpotenzial.

Die Fluoreszenz von Lösungen und Zellsuspensionen wurde am Fluoreszenzspektrometer FluoroMax-2 (Horiba Jobin Yvon) gemessen. Besonders bei der Analyse des pH-Werts wurde diese Methode eingesetzt.

Als UV/VIS-Spektrometer wurde das Spektrophotometer UV mini 1240 (Shimadzu) verwendet. Hier wurden unter anderem Analysen des Hämatokritwertes durchgeführt.

Zudem wurden verschiedene Zentrifugen (5415D (Eppendorf), Biofuge Stratos (Heraeus) und andere) und Kleingeräte (unter anderem Osmometer automatic (Knauer)) verwendet.

## **3.2 Verwendete biologische Zellen**

### **3.2.1 Erythrozyten**

Die Entnahme von frischem, humanem Blut von freiwilligen, gesunden Spendern erfolgte am Sportmedizinischen Institut an der Universität des Saarlandes und in der Hämatostaseologie des Universitätsklinikums Homburg. Die Proben wurden bei 4°C mit EDTA oder Citrat als Antikoagulans gekühlt gelagert und innerhalb von 48 h verwendet.

Als Vorbehandlung zu den Versuchen an Erythrozyten wurden cirka 50 µl Vollblut in 1 ml physiologischer Lösung bei Raumtemperatur mit 2000 g für 3 min in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert. Der Überstand und der Buffy Coat wurden abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden die restlichen Zellen drei Mal mit 1 ml physiologischer Lösung gewaschen (Abzentrifugieren bei Raumtemperatur mit 2000 g für 3 min). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen nicht resuspendiert, sondern mit 16000 g für 20 s abzentrifugiert und gepackt.

### **3.2.2 Caco-2-Zellen**

Die Kultivierung von Caco-2-Zellen wurde im Institut für Pharmazeutische Biotechnologie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Der Zellklon C2Bbe1 (von American Tissue Culture Collection (ATCC)) wurde in Dulbeccos modified eagle medium (DMEM) mit Zusätzen von Glucose, L-Glutamin, 10% fetalem Kälberserum und 1% nicht essentieller Aminosäuren bei einer Temperatur von 37°C unter Standard-Kulturbedingungen in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zwei bis drei mal pro Woche wurde das Medium gewechselt.

Die so gewachsenen Caco-2-Zellen wurden mit Trypsin vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Trypsin, eine Protease, spaltet bei kurzer Einwirkung (einige Minuten) nur extrazelluläre Proteine, mit denen die Zellen untereinander

und am Boden adhären. Die isolierten Caco-2-Zellen wurden drei Mal mit 1 ml physiologischer Lösung gewaschen (Abzentrifugieren bei Raumtemperatur mit 2000 g für 3 min) und anschließend mit 16000 g für 20 s gepackt.

### **3.3 Nanopartikel**

Verschiedene Nanopartikel wurden verwendet, um Größen und Materialien in ihrem Effekt auf wichtige physiologische Parameter miteinander zu vergleichen. Neben Metalloxid-Nanopartikeln ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  und  $\text{SiO}_2$ ) wurden noch Au-Nanopartikel untersucht. Eine Übersicht über die verschiedenen Nanopartikel ist in Tabelle 3 - 5 zu finden.

#### **3.3.1 Magnetische Eisenoxid ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )-Nanopartikel**

Die verwendeten  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel wurden im Rahmen des EU-Projektes NanoMagDye am IPCMS, Prof. Dr. G. Pourroy, Strasbourg, Frankreich synthetisiert. Die Herstellung von unbeschichteten  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln erfolgte durch Koprezipitation bei  $70^\circ\text{C}$  von  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen und einer  $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$ -Lösung (Daou et al., 2006). Die Nanopartikel wurden durch Röntgen-Diffraktion, magnetische Messungen und Elektronenmikroskopie charakterisiert. Eine Übersicht über die verwendeten Nanopartikel ist in Tabelle 3.

Citrat-umhüllte  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel wurden durch die Zugabe von Natriumcitrat in eine Wassersuspension von Nanopartikeln und das Einstellen des pH auf 4,0 hergestellt. Nach 24 h Rühren und mehreren Waschschritten lässt sich eine stabile Suspension von Citrat-umhüllten  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln erhalten.

Neben nackten und Citrat-stabilisierten  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln verschiedener Größen wurden im Rahmen des EU-Projektes NanoMagDye hergestellte  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel verwendet. Bei diesen handelt es sich um 10 nm große  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Kerne (hergestellt nach Daou et al., 2006), welche mit Dendrimeren umhüllt und an

einem Farbstoff gekoppelt sind (siehe Abbildung 7). Hier wurde ein hydrophiles, dendritisches Molekül ( $C_{41}H_{77}O_{22}P$ , 953,02 g/mol) über einen Phosphat-Linker auf die Oberfläche der  $Fe_3O_4$ -Nanopartikel ge-graftet (Daou et al., 2009; Basly et al., 2010). An dieses Dendrimer wurde in einer weiteren Reaktion der Farbstoff Patentblau V gekoppelt, wodurch die Nanopartikel eine Fluoreszenz (633, 660 nm) besitzen (Fe10-D1-B, Abbildung 8(a)) und Ansammlungen der Nanopartikel im Körper eine sichtbare Blaufärbung hervorrufen. Eine zweite Version von dendritischen  $Fe_3O_4$ -Nanopartikeln wurde hergestellt (Fe10-D2-B, Abbildung 8(b)). Sie besteht im Gegensatz zu den drei hydrophilen PEG-Gruppen aus nur einer, an die der Farbstoff bindet. Zusätzlich wurde auch das Phosphonat durch einen Anker aus Bisphosphonat ersetzt, wodurch eine stärkere Bindung an die Nanopartikel realisiert wird.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten  $Fe_3O_4$ -Nanopartikel und Komponenten untersuchte Komponenten.

Bezeichnung	Material	Größe	Grafting	Fluoreszenz
Fe10	$Fe_3O_4$	10 nm	-	-
Fe20	$Fe_3O_4$	20 nm	-	-
Fe30	$Fe_3O_4$	30 nm	-	-
Fe40	$Fe_3O_4$	40 nm	-	-
Fe10-Cit	$Fe_3O_4$	10 nm	Citrat	-
Fe10-D1	$Fe_3O_4$	10 nm	Dendrimer D1	-
Fe10-D1-B	$Fe_3O_4$	10 nm	Dendrimer D1 Patent Blau V	633 / 650-720
Fe10-D2-B	$Fe_3O_4$	10 nm	Dendrimer D2 Patent Blau V	633 / 650-720
D1			Dendrimer D1	
B			Patent Blau V	633 / 650-720
D1-B			Dendrimer D2/ Patent Blau V	633 / 650-720



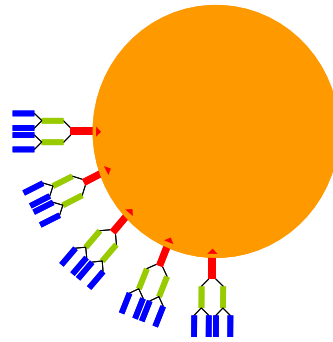


Abbildung 7: Dendritische Moleküle gegrattet an  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel. Orange:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel, rot: Phosphat-Linker, grün: Dendrimer, blau: spezifische Gruppe (Farbstoff).

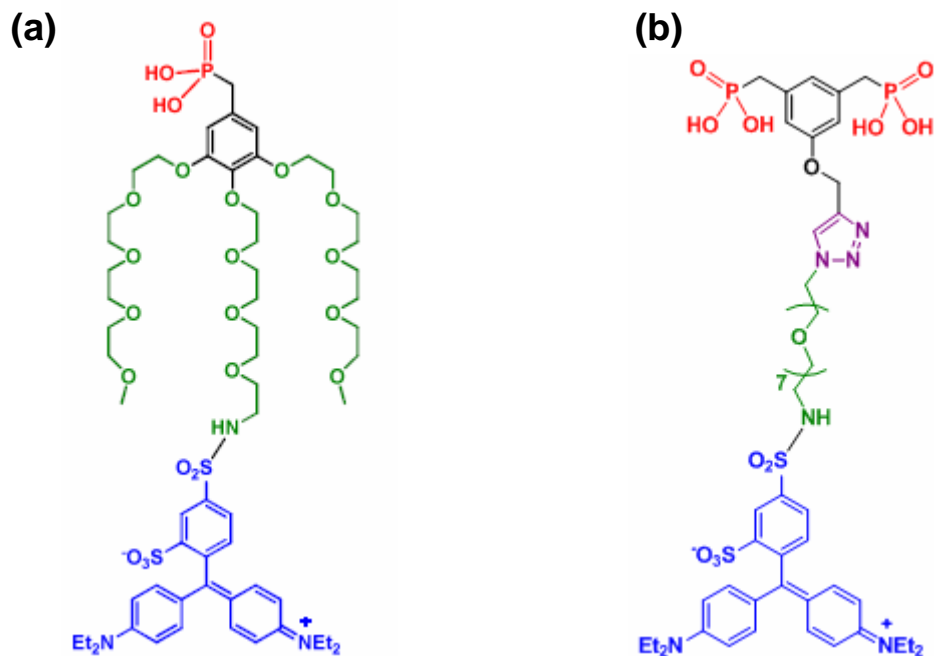


Abbildung 8: Struktur der Dendrimere (a) D1-B und (b) D2-B. Rot: Phosphat-Linker, grün: Dendrimer, blau: spezifische Gruppe (Farbstoff).

### 3.3.2 Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ )-Nanopartikel

Die verwendeten  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikel wurden am Institut für Neue Materialien (INM), Dr. A. Kraegeloh in Saarbrücken, Deutschland nach der Methode von Hartlen et al. (2008) hergestellt und charakterisiert. Drei Größen wurden als

Vergleich herangezogen (mit einem Durchmesser von 25, 45 und 80 nm). Durch die Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff kann die Aufnahme und Interaktion der Partikel mit Zellen beobachtet werden. Das Maximum der Anregung liegt bei 648 nm, das Emissionsmaximum bei 663 nm. In Tabelle 4 ist eine Übersicht über die verwendeten Nanopartikel und Komponenten aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel.

Bezeichnung	Material	Größe	Grafting	Fluoreszenz
Si25	SiO <sub>2</sub>	25 nm	-	648 / 663
Si45	SiO <sub>2</sub>	45 nm	-	648 / 663
Si80	SiO <sub>2</sub>	80 nm	-	648 / 663

### 3.3.3 Gold (Au)-Nanopartikel

Neben den beiden Metalloxid-Nanopartikeln wurden noch die Einflüsse von Au-Nanopartikeln untersucht. Diese wurden in der Arbeitsgruppe für Pharmazeutische Nanotechnologie, Prof. Dr. M. Schneider, der Universität des Saarlandes hergestellt (Reum et al., 2010). Verschiedene Größen der in Citrat stabilisierten Au-Nanopartikel standen zur Verfügung (mit einem Durchmesser von 15, 17, 18, 25, 30 und 50 nm). In Tabelle 5 ist eine Übersicht über die verwendeten Nanopartikel und Komponenten aufgelistet.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Nanopartikel.

Bezeichnung	Material	Größe	Grafting	Fluoreszenz
Au15	Au	15 nm	-	-
Au17	Au	17 nm	-	-
Au18	Au	18 nm	-	-
Au25	Au	25 nm	-	-
Au30	Au	30 nm	-	-
Au50	Au	50 nm	-	-

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen wurde nach Inkubation mit den Au-Nanopartikeln betrachtet. Zusätzlich wurde bei den  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln die Cytotoxizität anhand der Hämolyse von Erythrozyten und der Cytotoxizitäts-Assays LDH- und XTT-Assay untersucht. Bei den fluoreszenten Nanopartikeln wurde auch die Aufnahme beziehungsweise Anhaftung an Zellen betrachtet.

In Zusammenarbeit mit Dr. M. Khvedelidze von der Staatlichen Universität Tiflis, Georgien wurden Au-Nanopartikel hergestellt, welche zusammen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein in Liposomen aus 1,2-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC) und Cholesterol gehüllt waren. Hier wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob eine Aufnahme der Nanopartikel in Caco-2-Zellen erfolgt. Zellen, die die Liposomen mit dem internalisierten Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen haben, sind eindeutig erkennbar.

#### **3.4 Polyurethan (PU)-Nanofasern**

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Voinova von der Technischen Hochschule Chalmers, Göteborg, Schweden wurden mittels Elektrosponning zu einem Netz verwobene PU-Fasern mit einer Breite von wenigen Nanometern hergestellt. Im Anschluss wurde ein Teil der PU-Fasern durch eine Sauerstoff-Plasma-Behandlung modifiziert. Hier wurden Eindringtiefe, -geschwindigkeit und Formveränderungen von Erythrozyten betrachtet.

#### **3.5 Nanostrukturierte Oberflächen**

Nanostrukturierte Oberflächen haben aufgrund der oben genannten besonderen Eigenschaften von nanoskaligen Materialien ebenso wie Nanopartikel spezielle Eigenschaften, die im Bezug auf eine biomedizinische Anwendung betrachtet werden müssen. In den folgenden Versuchen wurden abhängig von der

Eintauchgeschwindigkeit unterschiedlich bearbeitete SiO<sub>2</sub>-Oberflächen, hergestellt an der St.-Kliment-Ohridski-Universität, Dr. M. Milanova, Sofia, Bulgarien, betrachtet und deren Möglichkeiten des Einsatzes als Beschichtung von Gläsern in medizinischen Geräten untersucht. Hierzu wurde neben der Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auch eine Veränderung der Form der Erythrozyten beobachtet. Die einzelnen SiO<sub>2</sub>-Beschichtungen wurden mittels zweier verschiedener Verfahren hergestellt, dem sogenannten *spin coating* beziehungsweise *dip coating* mit einer Silizium-Alkoxid-Lösung. Nach anschließender Polykondensation und Hitzebehandlung formt sich eine gelartige Oberfläche. Bei der Methode des *dip coating* wurde die Eintauchgeschwindigkeit variiert von 0,1 mm/s bis zu 1,4 mm/s (Übersicht über die verwendeten SiO<sub>2</sub>-Oberflächen siehe Tabelle 6)

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten SiO<sub>2</sub>-Oberflächen.

Bezeichnung	Herstellung	Geschwindigkeit
O1	spin coated	30 s, 3000 min <sup>-1</sup> , 150 g
O2	dip coated	0,1 mm/s
O3	dip coated	0,2 mm/s
O4	dip coated	0,4 mm/s
O5	dip coated	0,6 mm/s
O6	dip coated	0,8 mm/s
O7	dip coated	1,0 mm/s
O8	dip coated	1,2 mm/s
O9	dip coated	1,4 mm/s

### 3.6 Kohlenhydrat-synthetisierte Polypeptide

Im Rahmen einer Kooperation mit der Organischen Makromolekularen Chemie, Prof. Dr. G. Wenz der Universität des Saarlandes wurden dort hergestellte Copolymere aus Lysinderivaten untersucht (Struktur in Abbildung 9, Übersicht über die verschiedenen Zucker in Tabelle 7). Diese bestehen aus einem Lysin-Rückgrat, gekoppelt mit 2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)essigsäureamid und mit

verschiedenen Zucker-Seitengruppen und dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein kovalent verbunden. Statt dem Fluoreszenzmarker lassen sich in der Synthese verschiedenste Substanzen an das Rückgrat binden, so zum Beispiel medizinisch wirksame Substanzen. Die Variation der Zucker dient der gerichteten Steuerung an bestimmte Zelltypen (zum Beispiel beim drug targeting), da abhängig vom Zelltyp für unterschiedliche Zucker Rezeptoren in der Zellmembran existieren.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Polypeptide.

Bezeichnung	Zucker
PP1	-
PP2	Galactose
PP3	Mannose
PP4	Glucose

Die Polypeptide wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml zu 2 µl Erythrozyten gegeben und für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde überschüssiges Peptid durch Waschen (2000 g, 5 min) aus dem Überstand entfernt. Die erhalten Erythrozyten wurden auf einen Objektträger gebracht und nach 10 min (Zeit, die die Zellen zum Absetzen auf dem Objektträger benötigen) unter dem Mikroskop betrachtet. Die Fluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt, die Emission bei 510 nm gemessen.

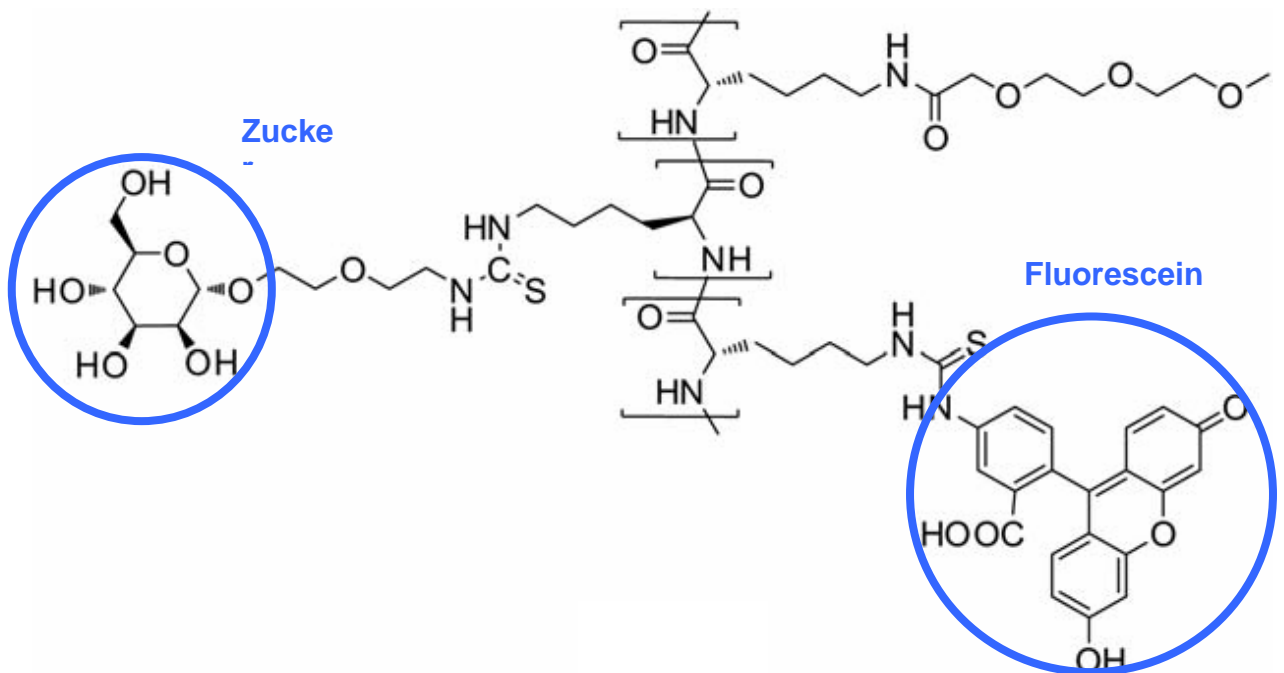


Abbildung 9: Struktur der glycosylierten Polypeptide, am Beispiel von PP3, in welchem Mannose gebunden wurde.

### 3.7 Fluoroalkylierte Phosphate

Drei verschiedene einzelkettige Moleküle (synthetisiert am Institut Charles Sadron, ICS, Prof. Dr. M. P. Krafft, Strasbourg, Frankreich (Krafft, 2001; Riess, 2009) deren Länge und die Anzahl der perfluorierten C-Atome variieren, wurden auf ihren Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und den intrazellulären pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen untersucht. Die allgemeine Formel der untersuchten einzelkettigen Moleküle lautet  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{m-1}(\text{CH}_2)_n - \text{O} - \text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ . Drei Moleküle mit variierenden Kettenlängen  $F_mH_n$  wurden zu Vergleichszwecken herangezogen: F8H11, F4H11, F8H2. Zusätzlich wurde das doppelkettige Molekül  $(F_6H_6)_2$  GPC (Abbildung 10) untersucht und ein nicht-fluoriniertes Molekül  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  verglichen.

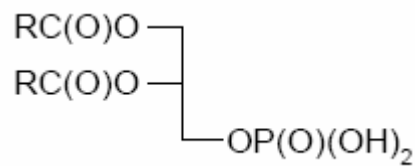


Abbildung 10: Strukturformel des doppelkettigen Moleküls (F6H6)<sub>2</sub> GPC. R = CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>.

### 3.8 Hämatokritwert-Bestimmungen

Der Hämatokritwert wurde über zwei verschiedene Methoden bestimmt. Als Schnelltest wurde die Zentrifugation in speziellen, mit Heparin (zur Verhinderung von Blutgerinnung) beschichteten Kapillaren durchgeführt. Hierfür wurden durch Kapillarkräfte die Proben in die entsprechenden Kapillaren gebracht, ein Ende mit etwas Wachs verschlossen und bei 15000 g für 5 min zentrifugiert. Zelluläre Bestandteile setzen sich an der einen Seite der Kapillare ab. Mit einem Lineal werden die Höhe der zellulären roten Bestandteile und die Gesamtfüllhöhe (Zellen und Plasma) gemessen und ins Verhältnis gesetzt (6). Der erhaltene Wert ergibt den Hämatokritwert (HK) der untersuchten Probe. Ein HK von 1 entspricht hierbei gepackten Zellen, also 100 % Erythrozyten.

$$HK = \frac{\text{Höhe(Erythrozyten)}}{\text{Höhe(total)}} \quad (6)$$

Als zweite Methode wurde der Hämatokritwert photometrisch nach der sogenannten Drabkin-Methode ermittelt. 100 µl der zu messenden Probe wurden mit 5 ml Drabkin's Reagenz für 30 min inkubiert. In dieser Zeit hämolysieren die Erythrozyten und das freigewordene Hämoglobin und seine Derivate (mit Ausnahme von Sulfhämoglobin) werden durch das enthaltene Kaliumhexacyanidoferrat (III) zu Methämoglobin oxidiert. Das entstandene Methämoglobin reagiert mit dem Kaliumcyanid zu Cyanmethämoglobin, was bei 540 nm ein Absorptionsmaximum besitzt. Die gemessene Farbintensität ist proportional zur Hämoglobinkonzentration. Als Kontrolle wurde die Absorption

von Drabkins-Reagenz allein gemessen. Dieser Wert wird von den ermittelten Messwerten subtrahiert. Der Hämatokritwert (HK) berechnet sich nun nach Formel (7) (Ellory und Young, 1982):

$$HK = \frac{A \cdot f(\text{Drabkin})}{CF} \quad (7)$$

$A$  = Absorption bei 540 nm,  $f(\text{Drabkin})$  = Verdünnungsfaktor der Erythrozyten im Reagenz,  $CF$  = Konversionsfaktor

Der Konversionsfaktor  $CF$  beinhaltet als Faktoren die molare Masse von Hämoglobin (circa 65500 g/mol), den molaren Extinktionskoeffizienten, den mittleren Hämoglobingehalt/Erythrozyt und einen Faktor für die Küvette (Schichtdicke). In unserem Versuchsaufbau beträgt der Konversionsfaktor  $CF$  247.

### 3.9 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Für die verschiedenen Fragestellungen (intrazellulärer pH,  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, Membranpotenzial, Apoptose) wurden die passenden Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt und benutzt. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Farbstoffe und deren charakteristische Wellenlängen. Aufgrund experimenteller Vorgaben (Laser, Monochromator, Filter) weichen die benutzten Setups geringfügig von den Fluoreszenzmaxima der Substanzen ab.



Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und deren charakteristische Absorptions- und Emissionswellenlängenmaxima. In Klammern sind die Wellenlängen angegeben, die in den Messungen genutzt wurden. (\*) bei fura-2 wurde die Zwei-Photonen-Anregung mit 720 nm statt 360 nm gewählt.

Farbstoff	Marker für	Anregung [nm]	Emission [nm]
Annexin V-FITC	PS-Exposition (Apoptose)	494 (488)	518 (515)
BCECF AM	pH <sub>i</sub>	436/505	531
DiBAC	Membranpotenzial	490 (488)	516 (515)
fluo-4 AM	Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	491 (488)	516 (515)
fura-2 AM	Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	335 /363 (720) *	505/512 (510) *

Acetoxymethyl (AM)-Ester-Derivate von Fluoreszenzfarbstoffen bieten bei der Untersuchung von lebenden Zellen einen großen Nutzen. Durch die Modifikation von Carboxygruppen mit der AM-Ester-Gruppe wird das jeweilige Molekül ungeladen, so dass es die Zellmembran durchdringen kann. Im Inneren der Zelle spalten nonspezifische Esterasen die AM-Gruppe ab, so dass das nun geladene Molekül kaum noch durch die Membran diffundieren kann. Der verbleibende Farbstoff, welcher sich nach der Einstellung eines Gleichgewichts im umgebenden Medium befindet, kann anschließend durch Waschen entfernt werden. Da die Hintergrundfluoreszenz dadurch sinkt, lassen sich in den Zellen geringere Konzentrationen an Farbstoff und der entsprechenden Substanz detektieren.

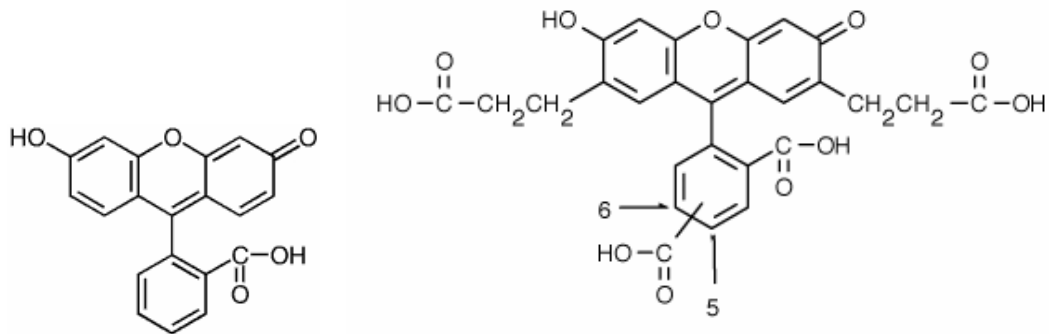
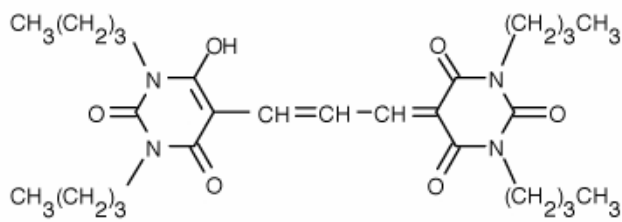
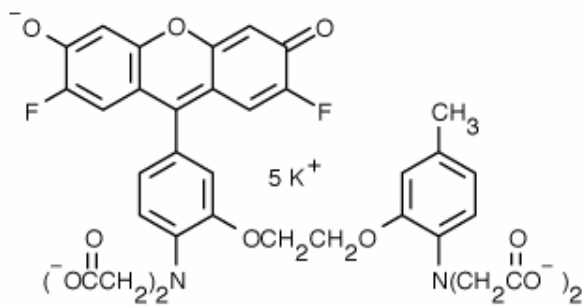
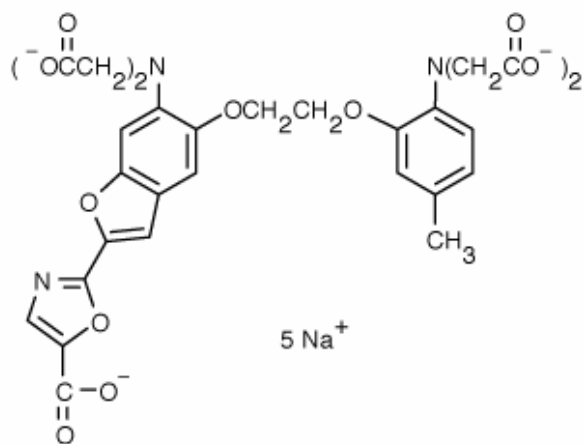
**Fluorescein****BCECF****DiBAC<sub>4</sub>(3)****fluo-4****fura-2**

Abbildung 11: Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

### Annexin V-FITC

Annexin V ist ein Typ der Annexine, einer Familie von Proteinen, welche an Lipide der Zellmembran binden können.  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig bildet Annexin V Bindungen zu dem negativ geladenen Phosphatidylserin. Da Annexin V nicht membrangängig ist, kann es lediglich an PS und damit an die Zelle binden, wenn dieses zur Außenseite der Membran translokiert wurde. Somit ist Annexin V ein Marker für die einsetzende Apoptose, bei der PS von der Innenseite der Membran zur Außenseite transportiert wird. Das vorliegende Annexin V wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, ein Fluoresceinderivat, Strukturformel von Fluorescein siehe Abbildung 11) als Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Das Maximum der Anregungswellenlänge von FITC und dem gekoppelten Annexin V-FITC liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 518 nm (Abbildung 12).

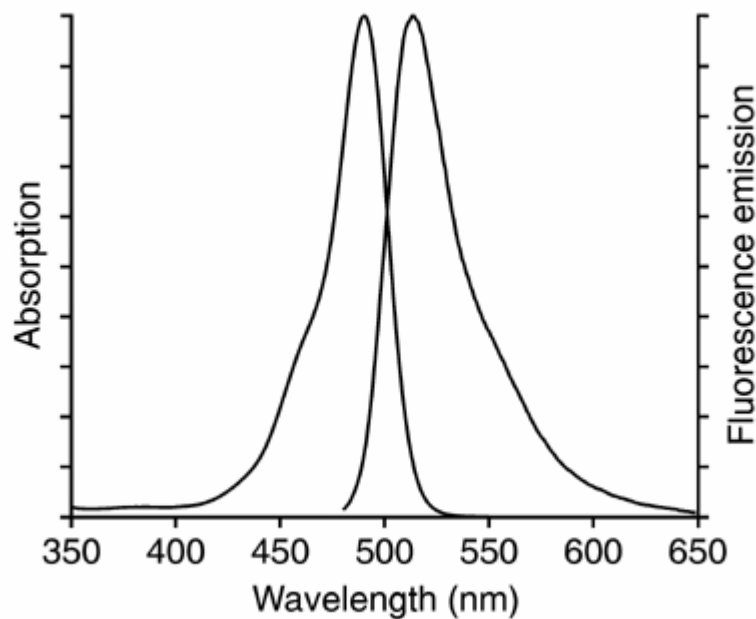


Abbildung 12: Absorptions- und Emissionsspektrum von Fluorescein (aus: Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes).

## **BCECF**

BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein, Strukturformel Abbildung 11) liegt als AM-Ester vor und kann so in die Zelle gebracht werden. BCECF kann Protonen als Liganden binden und abhängig von der Konzentration ändert sich das Fluoreszenzspektrum. BCECF gehört durch seine Fluoreszenzeigenschaften zu den ratiometrischen Farbstoffen. Diese besitzen einen sogenannten isosbestischen Punkt, eine Wellenlänge, bei der sich die Anregung nicht ändert. Dieser Punkt liegt für BCECF bei 436 nm. Aus den Werten (Abbildung 13) für die Messung der Fluoreszenz am isosbestischen Punkt (bei 531 nm) und im Anregungsmaximum (505 nm, Fluoreszenz bei 531 nm) lässt sich ein Quotient bilden. Ratiometrische Fluoreszenzmessungen erlauben im Gegensatz zu den nicht-ratiometrischen Messungen eine quantitative Konzentrationsbestimmung. Bei den übrigen Farbstoffen lässt sich lediglich eine qualitative Aussage treffen. Zusätzlich bringt die ratiometrische Messung weitere Vorteile, so gleicht sie Fehler in der Farbstoffbeladung und -aufnahme aus, ebenso werden eine Ausbleichung des Farbstoffs und ein mögliches Quenching komplexiert (Kummerow, 1999).

## **DiBAC<sub>4</sub>(3)**

DiBAC<sub>4</sub>(3) (bis-(1,3-dibutylbarbiturat)trimethinoxonol, Strukturformel Abbildung 11) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in depolarisierte Zellen eindringen kann, wo er an intrazelluläre Proteine bindet und eine erhöhte Fluoreszenz und eine Verschiebung in den roten Spektralbereich zeigt. Eine erhöhte Depolarisation führt zu einem vermehrten Influx von DiBAC<sub>4</sub>(3) in die Zelle, im Gegensatz dazu ist eine Hyperpolarisation durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität gekennzeichnet. Das Anregungsmaximum liegt bei 490 nm, das Emissionsmaximum bei 516 nm.

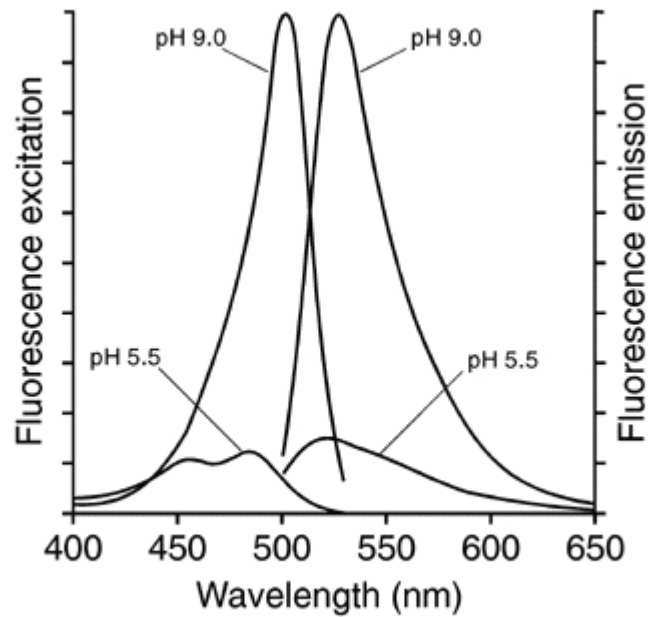


Abbildung 13: Absorptions- und Emissionsspektrum von BCECF bei pH 5,5 und pH 9,0 (aus: Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes).

#### fluo-4

Fluo-4 (Strukturformel Abbildung 11) wird AM-Ester in die Zelle geladen. Er ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher freies intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann und hierdurch eine erhöhte Fluoreszenz zeigt (Tsien, 1981). Aus der Veränderung der Intensität von fluo-4 lassen sich direkt Rückschlüsse auf eine Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes von Zellen ziehen. Die Maxima für Anregung und Emission von fluo-4 liegen bei 491 nm und 516 nm (Abbildung 14).

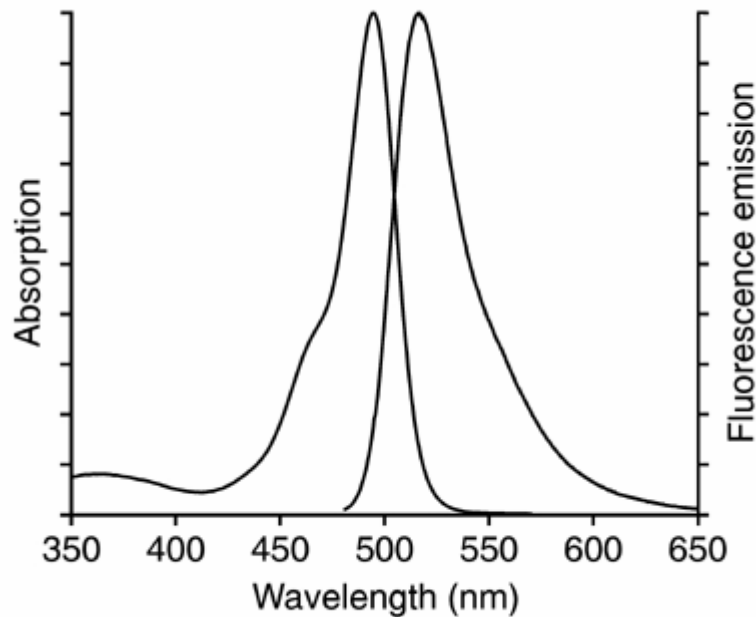


Abbildung 14: Absorptions- und Emissionsspektrum von fluo-4 (aus: Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes).

### fura-2

Fura-2 (Strukturformel Abbildung 11) wird als AM-Ester eingesetzt. Mit dem Farbstoff lässt sich ebenso wie mit fluo-4 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration analysieren. Da die beiden Anregungsmaxima von fura-2 (Abbildung 15, links) im UV-Bereich bei 335 nm beziehungsweise 363 nm liegen, kommt es zu einer Interferenz mit Hämoglobin. Dieses hat (Abschnitt 2.1.1) ein Absorptionsmaximum im selben Wellenlängenbereich, wodurch es zu einer Überlagerung der Fluoreszenzen von Hämoglobin und Farbstoff kommt. Hier empfiehlt es sich beim Einsatz von fura-2 in Erythrozyten die Anregung nach der Multiphotonenmethode durchzuführen (Kaestner, 2005).

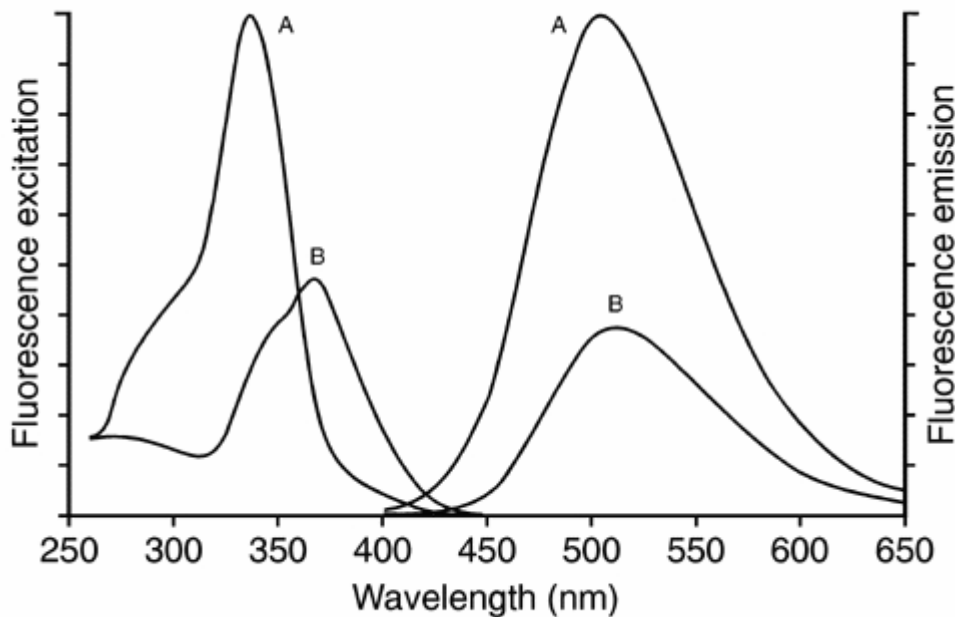


Abbildung 15: Absorptionsspektrum (gemessen bei 510 nm) und Emissionsspektrum (Anregung bei 340 nm) von fura-2 (A) in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Medium und (B) in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium (aus: Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes).

Da bei geringen Fluoreszenzintensitäten auch mittels der Multiphotonenmethode eine Interferenz mit Hämoglobin (siehe Abschnitt 2.1) nicht ausgeschlossen werden kann und eine ratiometrische Analyse nicht einwandfrei durchgeführt werden, wurden nachfolgend sämtliche Versuche zur Bestimmung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit fluo-4 AM durchgeführt und aufgezeigt.

### 3.10 Fluoreszenzspektroskopische Messungen des intrazellulären pH-Wertes und der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Das verwendete Fluoreszenzspektrometer besteht aus einer Lichtquelle, einem Monochromator und einem Detektor. Der Monochromator erzeugt aus dem Anregungslicht der Xenon-Lichtquelle (150 W) einen monochromatischen

Lichtstrahl der gewählten Wellenlänge und leitet diesen fokussiert auf die Probe. Im Winkel von 90° wird nun die Fluoreszenz der Probe gefiltert, in einem Photomultiplier verstärkt und detektiert.

### **3.10.1 Fluoreszenzspektroskopische Messung des intrazellulären pH-Wertes**

2 µl gepackte Zellen (Erythrozyten oder Caco-2-Zellen) wurden in 500 µl physiologischer Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde bei 37 °C für 45 min mit 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF AM inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit 250 µl physiologischer Lösung gewaschen (abzentrifugiert bei Raumtemperatur mit 2000 g für 5 min) und in 1 ml physiologischer Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Nanopartikel und Substanzen zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde im Anschluss auf 4 ml verdünnt und in eine Küvette gefüllt. Für die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes wurde das Fluoreszenzsignal von BCECF bei 531 nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 436 nm und 505 nm. Die beiden erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden als Quotient dargestellt.

Zur Kalibrierung und der Kalkulation des intrazellulären pH-Wertes aus den erhaltenen Fluoreszenzquotienten wurden die Zellen mit BCECF AM und der jeweiligen BCECF-Kalibrierlösung anstelle der physiologischen Lösung inkubiert. Damit der intrazelluläre pH-Wert dem extrazellulären, eingestellten pH-Wert der Lösungen entspricht, wurden 5 min vor Beginn der Messung 5 µM Nigericin zugegeben. Nigericin ist ein  $K^+/H^+$ -Ionophor, so dass sich ein Gleichgewicht beider Ionen zwischen innerem und äußerem Medium einstellt. Da die Konzentration von  $K^+$  im Inneren der Zelle und in der Lösung gleich ist, hat das Ionophor nur auf den Konzentrationsunterschied der Protonen eine Wirkung, wodurch sich dieser ausgleicht. Aufgrund des geringen Volumens an Erythrozyten im Vergleich zum Medium kann der intrazelluläre pH-Wert gleich dem pH-Wert der umgebenden Lösung angesehen werden (8).



$$pH_i = pH_o \quad (8)$$

Daraus resultierend lässt sich aus der Kalibriergeraden die Fluoreszenz der Proben in den pH-Wert umrechnen.

### **3.10.2 Fluoreszenzspektroskopische Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration**

2 µl gepackte Zellen (Erythrozyten oder Caco-2-Zellen) wurden in 500 µl physiologischer Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde bei 37 °C für 45 min mit 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffes (fluo-4 AM) inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit 250 µl physiologischer Lösung gewaschen (abzentrifugiert bei Raumtemperatur mit 2000 g für 5 min) und in 1 ml physiologischer Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Nanopartikel und Substanzen zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde im Anschluss auf 4 ml verdünnt und in eine Küvette gefüllt. Für die Bestimmung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde das Fluoreszenzsignal von fluo-4 bei 520 nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm.

### **3.11 Fluoreszenzmikroskopische Messungen des intrazellulären pH und der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, Analyse der Form von Erythrozyten**

Für mikroskopische Untersuchungen von einzelnen Zellen wurden abhängig von der Fragestellung drei verschiedene inverse Mikroskope eingesetzt. Als Lichtquelle dienen bei den beiden konventionellen Fluoreszenzmikroskopen Xenon-Lampen (UX L-75XE, Ushio, Japan) mit einem konstanten Spektrum von 300 nm bis 800 nm. Mit einem Polychromator kann das Licht auf die gewünschte Wellenlänge gefiltert und auf die Probe geleitet werden. Das von der Probe ausgesendete Fluoreszenzlicht wird gefiltert und durch die CCD (charged coupled device)-Kamera verstärkt und detektiert. Durch den Aufbau des CCD-Chips in

vielen Pixeln ist es möglich, neben einer schnellen, zeitlichen Auflösung auch eine gute räumliche Auflösung zu erreichen. Bei einer Messung können bis zu 20 Zellen gleichzeitig beobachtet werden.

Das verwendete Konfokalmikroskop arbeitet statt mit einer Xenon-Lampe und einem Polychromator als Lichtquelle mit verschiedenen Lasern, welche abhängig vom Spektrum auf konkrete Wellenlängen eingestellt sind. Ein zusätzlicher Laser (Coherent Chameleon, USA) lässt sich in einem Bereich von 700 nm bis 750 nm frei einstellen.

#### **3.11.1 Fluoreszenzmikroskopische Messung des intrazellulären pH-Wertes**

2  $\mu\text{l}$  gepackte Erythrozyten wurden in 500  $\mu\text{l}$  physiologischer Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde bei 37 °C für 45 min mit 1  $\mu\text{l}$  des Fluoreszenzfarbstoffes (BCECF AM) inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit 250  $\mu\text{l}$  physiologischer Lösung gewaschen (abzentrifugiert bei Raumtemperatur mit 2000 g für 5 min), auf 1 ml verdünnt und anschließend mit den zu untersuchenden Nanopartikel und Substanzen für 30 min bei 37 °C inkubiert. 200  $\mu\text{l}$  der Probe wurden mit 1 ml physiologischer Lösung auf das Objektglas gegeben. Für die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes wurde das Fluoreszenzsignal von BCECF bei 531 nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 436 nm und 505 nm. Die beiden erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden als Quotient dargestellt.

Die Kalibrierung erfolgte analog zur fluoreszenzspektroskopischen Analyse wie unter 3.9.1 beschrieben.

### **3.11.2 Fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

2  $\mu\text{l}$  gepackte Zellen (Erythrozyten oder Caco-2-Zellen) wurden in 500  $\mu\text{l}$  physiologischer Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde bei 37 °C für 45 min mit 1  $\mu\text{l}$  des Fluoreszenzfarbstoffes (fluo-4 AM, fura-2 AM) inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit 250  $\mu\text{l}$  physiologischer Lösung gewaschen (abzentrifugiert bei Raumtemperatur mit 2000 g für 5 min) und in 1 ml physiologischer Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Nanopartikel und Substanzen für 30 min bei 37 °C inkubiert. 200  $\mu\text{l}$  der Probe wurden mit 1 ml physiologischer Lösung auf das Objektglas gegeben. Für die Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde das Fluoreszenzsignal von fluo-4 bei 520 nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm. Um eine Überlagerung der Anregungswellenlänge von fura-2 mit der von Hämoglobin zu vermeiden, wurden statt der Absorptionswellenlänge von 360 nm der Laser des Konfokalmikroskops auf 720 nm eingestellt. Die Fluoreszenz wurde bei 510 nm gemessen. Gemessen wurde bei Raumtemperatur mit einem Ölimmersionsobjektiv bei 100-facher Vergrößerung.

### **3.11.3 Auswertung der Fluoreszenzmessungen**

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit entsprechenden Imaging-Programmen. Hier wurden nach der Messung die Zellen durch eine ROI (Region of Interest) markiert. Die innerhalb dieser Flächen befindliche Fluoreszenzintensität wurde ermittelt, davon die Hintergrundintensität subtrahiert und in einem Diagramm aufgetragen.

Da im Rahmen der Promotion zum Teil verschiedene Mikroskopie-Messplätze eingesetzt werden mussten, können die Diagramme nicht zu quantitativen Vergleichen herangezogen werden. Sowohl in der Sensitivität als auch in der Intensität der Fluoreszenz und dem Hintergrundsignal sind bei den unterschiedlichen Messplätzen deutliche Unterschiede zu erkennen. Die

Messungen, die zum Vergleich geeignet sind, sind in der Regel in einem Balkendiagramm dargestellt.

#### **3.11.4 Analyse der Zellform**

Die Zellform wurde mikroskopisch untersucht. Hierzu wurden 2 µl gepackte Zellen in 500 µl physiologischer Lösung resuspendiert und bei 37 °C für 30 min auf der entsprechenden Oberfläche inkubiert. Im Anschluss wurden bei einer geeigneten Vergrößerung die Zellen im Mikroskop im Durchlicht betrachtet.

### **3.12 Durchflusszytometrische Fluoreszenzmessungen der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, der PS-Exposition und des Membranpotenzials**

#### **3.12.1 Durchflusszytometrische Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Zur Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von einzelnen Zellen wurde neben der mikroskopischen Untersuchung die Durchflusszytometrie als *high-throughput*-Methode eingesetzt. Diese erlaubt die Analyse der Fluoreszenz von über 1000 Zellen pro Sekunde. Hierzu wurden die Zellen wie unter 3.11.2 mit Farbstoff beladen und mit den Nanopartikeln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine spezielle Messlösung umgefüllt und im Durchflusszytometer analysiert. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Nach der Analyse wurden die mittleren Durchschnittswerte im Diagramm eingetragen. Zum Vergleich einzelner Messungen zueinander werden die jeweiligen Kurven in einer Grafik übereinander gelegt und verglichen.

Tabelle 9: Spannungs-Parameter der Durchflusszytometer-Analyse

	Ca <sup>2+</sup>	PS	DiBAC <sub>4</sub> (3)
FSC	1	1	1
SSC	350	400	350
Anregung	600 (Erythrozyten) 400 (Caco-2)	650	300
Schwellenwert FSC	50	50	50
Schwellenwert SSC	50	50	50
Zellen/Messung	20000-50000	20000	20000

### 3.12.2 Durchflusszytometrische Messung der PS-Exposition

Die PS-Exposition als Marker für die Apoptose von Zellen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Annexin V-FITC gemessen. Hierfür wurde 1 µl der gewaschenen und gepackten Erythrozyten in 1 ml physiologischer Lösung resuspendiert und mit den zu untersuchenden Substanzen bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss gepackt (Raumtemperatur, 16000 g, 20 s) und in 100 µl physiologischer Lösung resuspendiert. 4,5 µl Annexin V-FITC wurden dazu gegeben und bei Raumtemperatur für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von 400 µl physiologischer Lösung wurde die Messung im Durchflusszytometer gestartet. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Der Anteil von PS-positiven Erythrozyten in der Gesamtmenge der analysierten Zellen wurde als Maß für die Apoptose ermittelt. Die Höhe des Anteils ist direkt proportional zur Apoptosestärke. Zu bemerken ist, dass neben diesem Wert auch die absolute Zellzahl betrachtet werden muss. In den vorliegenden Versuchen konnten lediglich die Zellen ermittelt werden, die eine Apoptose eingeleitet haben. Tote und lysierte Zellen können im vorhandenen Setup nicht direkt detektiert werden, da sie unter dem Schwellenwert und zusammen mit etwaigen aggregierenden Nanopartikeln gemessen werden. Da die Erythrozyten keinen

Zellkern besitzen, ist auch der Unterschied von Apoptose und Nekrose nicht erkennbar.

### **3.12.3 Messung des Membranpotenzials**

Das Potenzial der Erythrozytenmembran wurde mit dem fluoreszenten Farbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) analysiert. Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurden jeweils 50 ml einer 100-fachen Verdünnung der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung in physiologischem Puffer (250 nm) frisch angesetzt. 2 µl gepackte Erythrozyten wurden mit 1 ml der angesetzten DiBAC<sub>4</sub>(3)-Lösung bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht der Farbstoffkonzentration zwischen Zelle und umgebendem Medium einstellt. Nanopartikel wurden im Anschluss zur Zellsuspension gegeben und alle 5 min über 30 min im Durchflusszytometer beobachtet. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Zur Betrachtung einer Membranpotenzialänderung beim Wechsel des Mediums wurden die mit DiBAC<sub>4</sub>(3)-Lösung inkubierten Zellen abzentrifugiert und in den entsprechenden DiBAC<sub>4</sub>(3)-LIS-Lösungen (LIS200 beziehungsweise LIS250) resuspendiert. Unverzüglich wurde mit der Analyse im Durchflusszytometer begonnen und über 30 min eine Messreihe durchgeführt.

### **3.13 Aufnahme von Nanopartikeln**

Die Aufnahme von Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden die beiden Nanopartikel Fe10-D1-B und Fe10-D2-B eingesetzt. Diese sind als Nanopartikel konzipiert, welche in der Krebsdiagnose eingesetzt werden sollen. Da beide Partikel an den Farbstoff Patent Blau V gekoppelt sind, lassen sie sich in mikroskopischen Experimenten anhand ihrer Fluoreszenz nachweisen.

Um klarzustellen, welcher der vier Mechanismen (siehe Abschnitt 2.2.7) für die Aufnahme der Nanopartikel in Zellen verantwortlich ist, wurden die Mechanismen gezielt durch die Zugabe der Inhibitoren blockiert. Hierzu wurden die Caco-2-Zellen mit je 5 µg Cytochalasin D oder 10 µg Chlorpromatine beziehungsweise Nystatin bei 37°C für 30 min inkubiert. Ein weiterer Ansatz wurde mit einer Kombination aller drei Inhibitoren durchgeführt. Im Anschluss wurden die Nanopartikel dazu gegeben und erneut bei 37°C für 30 min inkubiert. Unter dem Konfokalmikroskop wurde geprüft, ob die Nanopartikel im Inneren der Zelle zu finden sind.

Versuche an Erythrozyten wurden ebenfalls durchgeführt. Da diese keine der bekannten Aufnahmemechanismen zeigen, wurde nicht mit den Inhibitoren gearbeitet. Eine Aufnahme in Erythrozyten lässt Rückschlüsse auf eine passive Durchdringung der Membran zu.

#### **3.14 Zytotoxizitäts-Test**

Die Zytotoxizität von chemischen Substanzen ist ihre Fähigkeit, Zellen zu schädigen. Zum Nachweis der Toxizität lassen sich verschiedene Methoden einsetzen, die in der Regel auf der Fähigkeit von Zellen beziehungsweise deren Enzymen, eine Substanz in eine andere umzuwandeln, basiert. Bekannte Tests sind unter anderem der Lactatdehydrogenase (LDH)-, Neutralrot- oder MTT-Test.

##### **3.14.1 LDH-Test**

Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches die Oxidation von Lactat zu Pyruvat unter Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}/\text{H}^+$  und die Rückreaktion katalysiert. Sollten Zellen bei der Inkubation mit toxischen Substanzen absterben, so lassen diese durch das Aufbrechen der Membranen Lactatdehydrogenase in

das umgebende Medium frei. Dieses kann nun durch die Rückreaktion indirekt über den Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  nachgewiesen werden.

Die Caco-2-Zellen wurden in einer 96-Well-Platte in einer Dichte von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/Well ausgesät und 2 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubationsschrank wachsen gelassen. Im Anschluss wurden  $500 \mu\text{g/ml}$  Nanopartikel für 1 Stunde zu den Zellen gegeben. Der Überstand wurde nun abgenommen,  $1 \text{ mM Na}^+$ -Pyruvat und  $0,2 \text{ mM NADH}$  wurden zu diesem dazugegeben. Nach 4 Stunden wurde die Absorption von  $\text{NAD}^+$  im Überstand bei  $360 \text{ nm}$  bestimmt.

#### 3.14.2 XTT-Test

Als zweiter Test wurde zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse des LDH-Tests der XTT-Test, eine Weiterentwicklung des MTT-Tests, durchgeführt. Im Gegensatz zum LDH-Test misst dieser nicht abgetötete Zellen und von diesen freiwerdende Substanzen, sondern die Enzymaktivität lebender Zellen. Der Test beruht auf der Aufnahme und anschließenden Reduktion des XTT (2,3 - Bis (2 - methoxy - 4 - nitro - 5 - sulfophenyl) - 5 - ((phenylamino)carbonyl) - 2H - tetrazoliumhydroxid) in ein unlösliches, violettes Formazan-Salz. Hierfür wurden Caco-2-Zellen in einer 96-Well-Platte in einer Dichte von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/Well ausgesät und 2 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubationsschrank angezogen.  $500 \mu\text{g/ml}$  Nanopartikel wurden für 1 h dazugegeben. Anschließend wurde die Suspension mit  $50 \mu\text{l}$  der XTT-labeling mixture (Roche) versetzt und für 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Absorption des Formazan-Salzes wurde bei  $492 \text{ nm}$  gemessen.

#### 3.15 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von unabhängigen Experimenten präsentiert. Die Signifikanz von Unterschieden wurde mit dem Student-t-Test untersucht. Unterschiede werden als signifikant angesehen bei  $p <$



0,05 und in den entsprechenden Diagrammen mit \* gekennzeichnet. Jedes Experiment wurde mindestens drei Mal wiederholt. Bei den Experimenten mit Erythrozyten wurde darauf geachtet, dass das Blut für die einzelnen Experimente von verschiedenen Spendern war.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Nanopartikel

#### 4.1.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel

Siehe auch Moersdorf, 2010.

Die in Tabelle 3 genannten Nanopartikel wurden im Bezug auf ihren Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert und den Ca<sup>2+</sup>-Gehalt von Erythrozyten und Caco-2-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde betrachtet, ob die Nanopartikel eine zytotoxische Wirkung besitzen. Hierfür wurden die Hämolyserate und die PS-Exposition von Erythrozyten analysiert und an Caco-2-Zellen die beiden gebräuchlichen Zytotoxizitäts-Tests LDH- und XTT-Assay durchgeführt.

#### Intrazellulärer pH-Wert

Der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen nach der Inkubation mit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF AM am Fluoreszenzspektrometer analysiert. Abbildung 16 zeigt die erhaltenen Ergebnisse für Erythrozyten, die Nanopartikel verschiedener Größe (oben) und mit den unterschiedlichen Graftings (unten) wurden in den Graphen aufgetragen. In Abbildung 17 sind die entsprechenden pH-Werte der Caco-2-Zellen aufgetragen. In Tabelle 10 sind die erhaltenen Werte aufgelistet.

In Rahmen des Projektes NanoMagDye wurden ebenfalls Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel untersucht, welche zusätzlich zur Kopplung an ein Dendrimer auch an den fluoreszenten Farbstoff Patent Blau V gekoppelt waren. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, ergibt sich keine Veränderung des pH-Wertes.

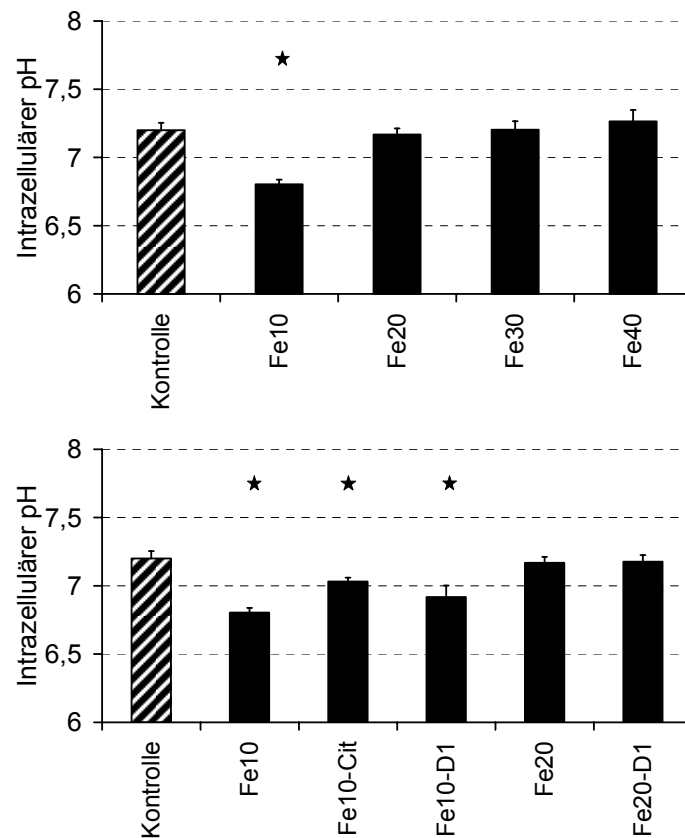


Abbildung 16: pH-Werte von Erythrozyten, inkubiert mit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln. oben: verschiedene Größen, unten: verschiedene Graftings. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ ,  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (\*).

Die pH-Werte für die Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel mit 10 nm Größe (Fe10, Fe10-Cit, Fe10-D1), in der Abbildung mit \* gekennzeichnet, sind signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle.

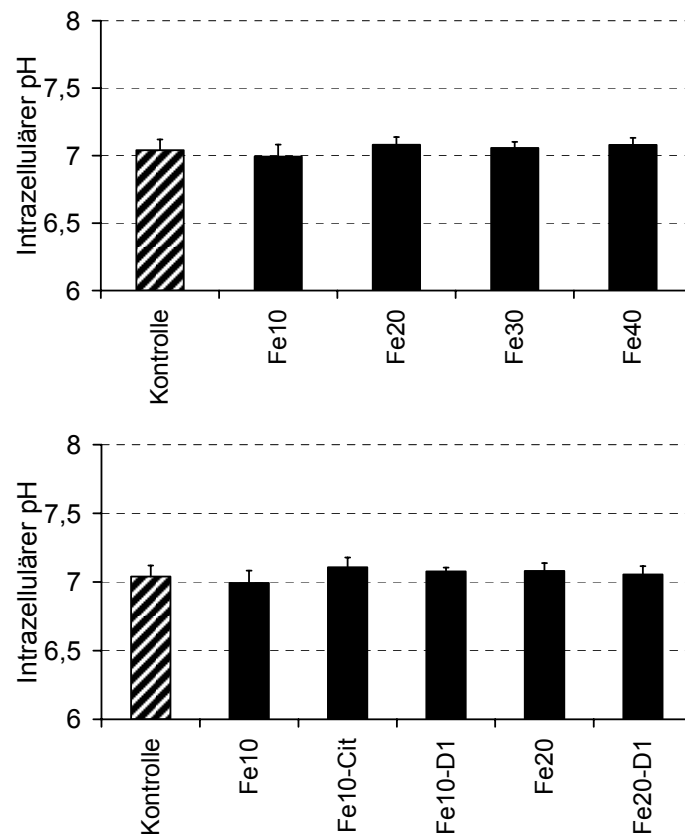


Abbildung 17: pH-Werte von Caco-2-Zellen, inkubiert mit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln. Oben: verschiedene Größen, unten: verschiedene Graftings. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ .

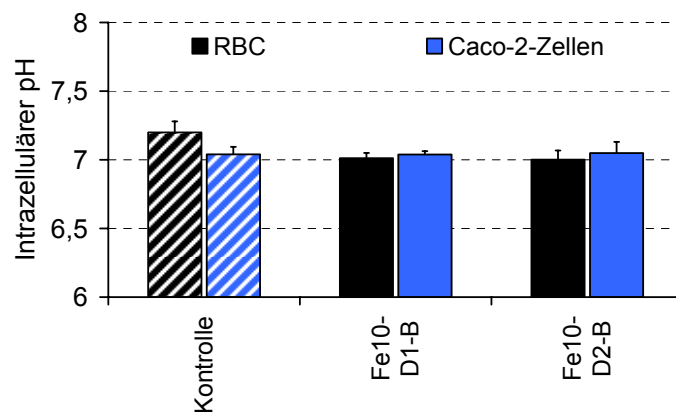


Abbildung 18: pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit Dendrimer- und Farbstoff-grafteten  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln. Schwarz: Erythrozyten, blau: Caco-2-Zellen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ .

Die pH-Werte für die Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel mit 10 nm Größe (Fe10, Fe10-Cit, Fe10-D1), in der Abbildung mit \* gekennzeichnet, sind signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Caco-2-Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, ebenso haben beide fertigen Nanopartikel (Fe10-D1-B und Fe10-D2-B) keinen Einfluss auf den pH beider Zelltypen.

Tabelle 10: Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln.

Nanopartikel	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	7,20	7,04
Fe10	6,80	6,99
Fe20	7,17	7,08
Fe30	7,20	7,06
Fe40	7,26	7,08
Fe10-Cit	7,03	7,11
Fe10-D1	6,92	7,08
Fe20-D1	7,18	7,06
Fe10-D1-B	7,01	7,04
Fe10-D2-B	7,00	7,05

### Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Mittels fluo-4 AM wurde die Fluoreszenzintensität von Erythrozyten und Caco-2-Zellen nach Inkubation mit den Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln bestimmt und daraus die relative Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ermittelt. Abbildung 19 zeigt die erhaltenen Ergebnisse für Erythrozyten, die Nanopartikel wurden abhängig von ihrer Größe (oben) und ihren Graftings (unten) aufgetragen. In Abbildung 20 sind die pH-Werte der Caco-2-Zellen aufgetragen. In Tabelle 11 sind die erhaltenen Werte aufgelistet.

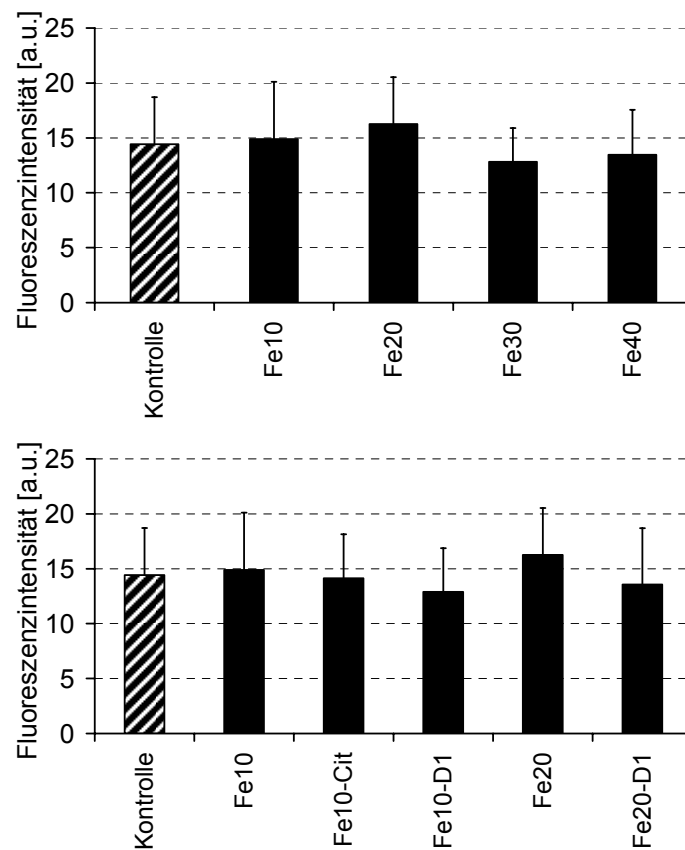


Abbildung 19: Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Erythrozyten, inkubiert mit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln. Oben: verschiedene Größen, unten: verschiedene Graftings. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ .

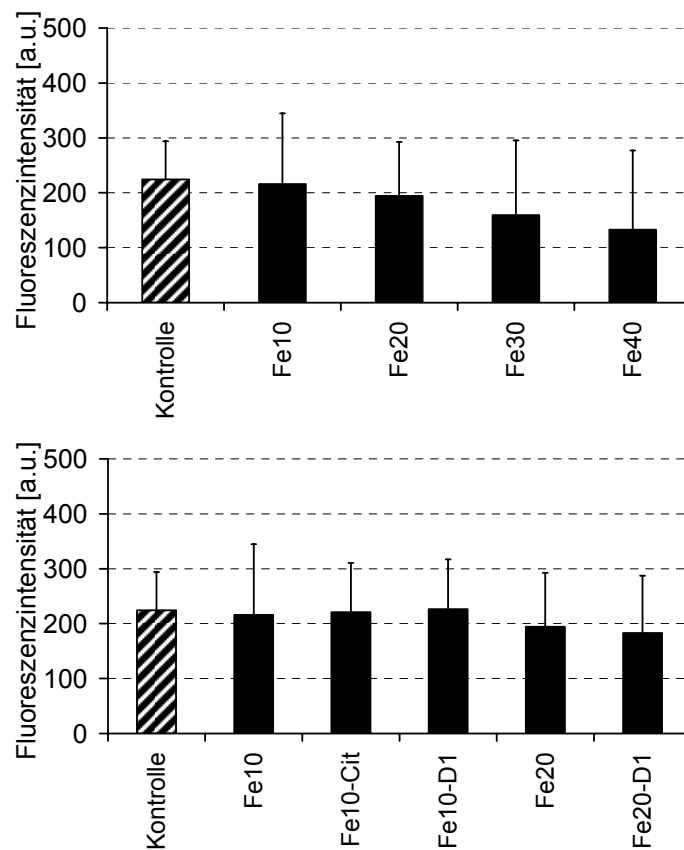


Abbildung 20: Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Caco-2-Zellen, inkubiert mit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln. Oben: verschiedene Größen, unten: verschiedene Graftings. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ .

Tabelle 11: Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln.

Nanopartikel	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	14,43	224,18
Fe10	14,89	215,80
Fe20	16,26	194,46
Fe30	12,82	159,28
Fe40	13,46	132,92
Fe10-Cit	14,14	220,96
Fe10-D1	12,89	226,37
Fe20-D1	13,57	182,96
Fe10-D1-B	15,23	215,01
Fe10-D2-B	14,92	219,50

Eine Analyse der ermittelten Werte ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Als Beispiel ist in Abbildung 21 eine Überlagerung der erhaltenen Durchflusszytometer-Analysen der Fluoreszenz von fluo-4 AM markierten Caco-2-Zellen nach der Inkubation mit gegratteten (Fe20-D1) beziehungsweise nicht gegratteten (Fe20) Nanopartikeln von 20 nm Durchmesser aufgetragen.

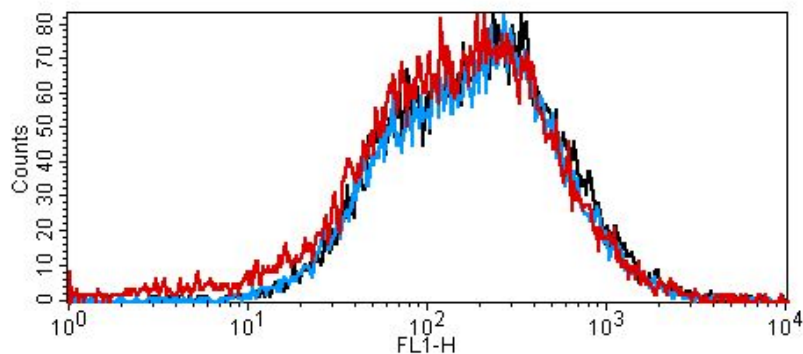


Abbildung 21: Durchflusszytometer-Analyse von Caco-2-Zellen, inkubiert mit Fe20 beziehungsweise Fe20-D1. Schwarz: Kontrolle, blau: Fe20, rot: Fe20-D1. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 3.

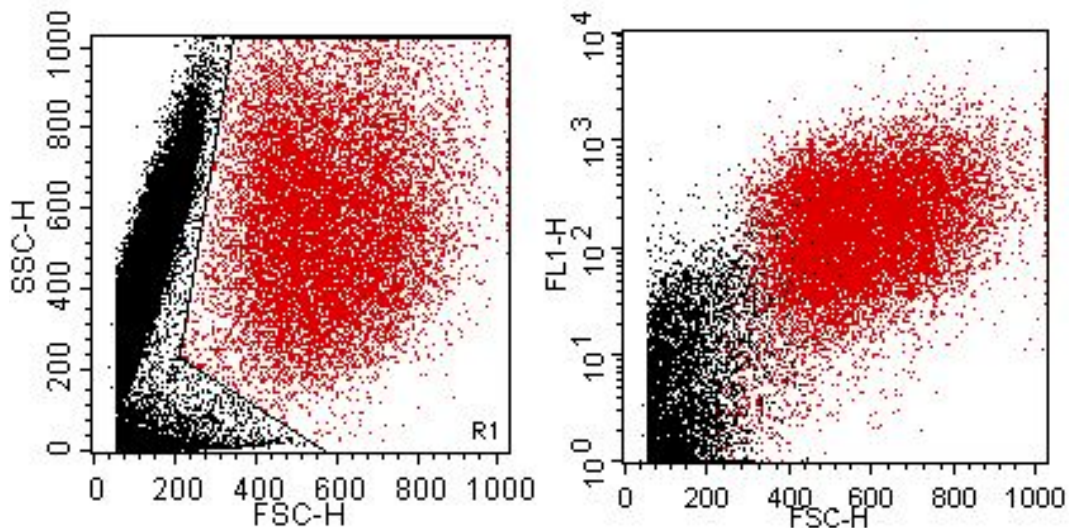


Abbildung 22: Durchflusszytometer-Analyse von Fe20-D1 mit fluo-4 AM markierten Caco-2-Zellen. Rot markiert: Zellen, schwarz: Aggregate von Nanopartikeln und Zelltrümmer (unten links). FSC: Vorwärtsstreulicht, SSC: Seitwärtsstreulicht, FL1: Fluoreszenz.



Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, geringe Unterschiede (niedrigere Maximalwerte und höhere Werte in niedrigen Fluoreszenzbereich) sind darauf zurückzuführen, dass Aggregate der Nanopartikel bei der Analyse nicht vollständig von den Zellen zu trennen waren (siehe Abbildung 22 links). Somit hat man in der Analyse der Zellen immer einen geringen Anteil an Nanopartikeln, welcher aber vernachlässigbar ist.

In Rahmen des Projektes wurden ebenfalls  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel untersucht, welche zusätzlich zur Kopplung an ein Dendrimer auch an den fluoreszenten Farbstoff Patent Blau V gekoppelt waren (Abbildung 23).

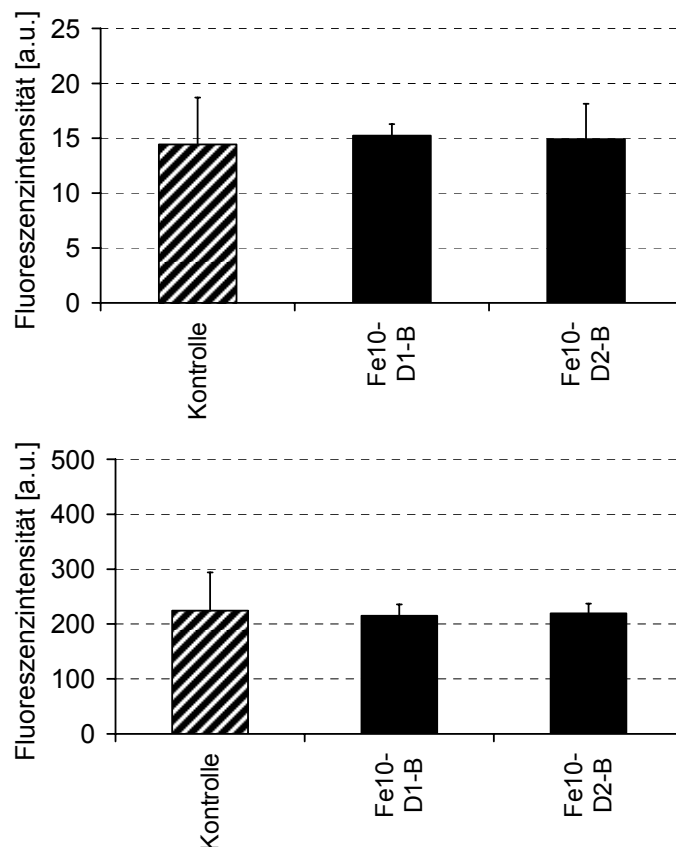


Abbildung 23: Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit Dendrimer- und Farbstoff-gegrafteten  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln. Oben: Erythrozyten, unten: Caco-2-Zellen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 3.  $n \geq 3$ .

Die Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ergab keine signifikanten Unterschiede. Weitere  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel mit anderen Kern-Durchmessern konnten bis zum Abschluss der Arbeit nicht getestet werden, da diese besonders bei höheren Durchmessern (zum Beispiel Fe20-D2-B) nicht genügend Stabilität besitzen und sich innerhalb weniger Stunden in ihre einzelnen Bestandteile aufspalten. Ebenso variiert die Stabilität der einzelnen Nanopartikel von Charge zu Charge. Abbildung 24 zeigt zwei an unterschiedlichen Tagen hergestellte NP10-D1-B.



Abbildung 24:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel NP10-D1-B in Suspension. Links: 4 Wochen alte Charge, rechts: neu produzierte Nanopartikel.

### Zytotoxizität

Die Toxizität der  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel wurde mit verschiedenen Methoden analysiert. Bei Erythrozyten wurden die Exposition von PS und die Hämolyserate betrachtet. Zusätzlich wurden mit Caco-2-Zellen die beiden Zytotoxizität-Assays (LDH-Assay und XTT-Assay) durchgeführt.

## PS-Exposition

Die PS-Exposition von Erythrozyten wurde mit den reinen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln sowie den im Projekt NanoMagDye genutzten fertigen gegrifteten Nanopartikeln (Fe10-D1-B, Fe10-D2-B) und aufgrund der möglichen Instabilität mit deren Einzelsubstanzen D1-B, D1 getestet (Abbildung 25). Wie bereits in Abbildung 24 gezeigt, kann eine Stabilität der Nanopartikel nicht vollkommen garantiert werden. Da die Einzelsubstanzen in der medizinischen Anwendung selbst eine Reaktion hervorrufen könnten, müssen diese ebenfalls analysiert werden.

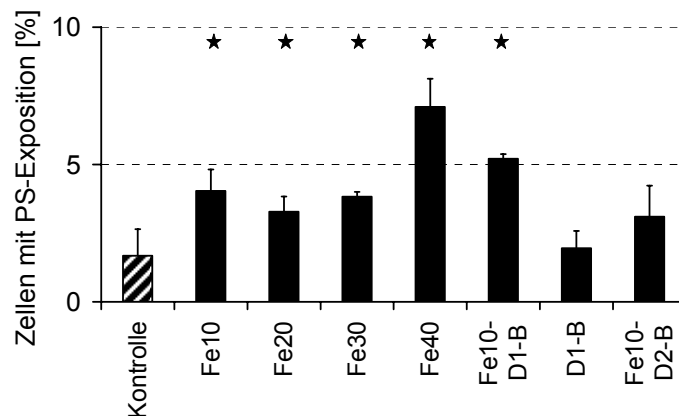


Abbildung 25: Prozentuale Anzahl an Erythrozyten, die nach Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel-Inkubation eine PS-Exposition zeigen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 3.  $n \geq 3$ ,  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (\*).

Die PS-Exposition ist für alle nackten Nanopartikel und den gegrifteten Partikel Fe10-D1-B signifikant erhöht (\*). Das Molekül D1-B alleine ergab keine Änderung, ebenso wie der gegriftete Nanopartikel Fe10-D2-B.

## Hämolyserate

Die Hämolyserate wurde photometrisch mittels der Drabkin-Methode ermittelt. In keinem Versuch konnte eine messbare Hämolyse der Erythrozyten nach der Inkubation mit den  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

## Zytotoxizitäts-Assays

Die beiden Zytotoxizitäts-Tests mit Caco-2-Zellen wurden parallel an den fertigen  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln (Fe10-D1-B und Fe10-D2-B) und den reinen Nanopartikeln von 10 bis 40 nm durchgeführt (Abbildung 26).

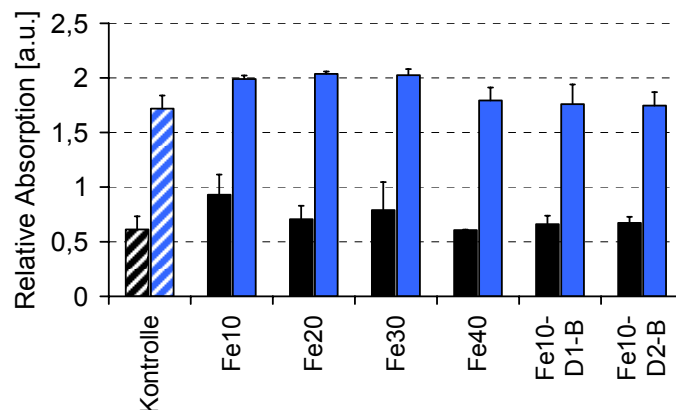


Abbildung 26: Relative Absorption der Marker in den beiden Zytotoxizitäts-Assays. Schwarz: LDH-Assay, gemessen bei 340 nm, blau: XTT-Assay, gemessen bei 492 nm. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 3.  $n \geq 3$ .

## Mikroskopische Beobachtungen von Einzelzellen und Aufnahme von Nanopartikeln

Abbildungen 27 und 28 zeigen typische Aufnahmen von Erythrozyten beziehungsweise Caco-2-Zellen, links mit dem Nanopartikel Fe10-D1-B und

rechts mit Fe10-D2-B. Hier wurden das Durchlichtbild und das Fluoreszenzbild übereinander gelegt, eine Anregung erfolgt bei 633 nm, der typischen Wellenlänge für Patent Blau V, welcher an die  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel gebunden ist, die Fluoreszenz der Nanopartikel wurde mit einem Filter bei  $>650$  nm gemessen.

Zur Identifizierung der Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln in Zellen wurde mit Caco-2-Zellen und den fluoreszenzmarkierten  $\text{Fe}_2\text{O}_4$ -Nanopartikeln Fe10-D1-B und Fe10-D2-B gearbeitet. Hier konnte unter dem Konfokalmikroskop anhand der Fluoreszenz der Nanopartikel beobachtet werden, ob sich die Partikel nach der Inhibierung einzelner Aufnahmemechanismen (Clathrin-, Caveolin-abhängig, Phagozytose) an oder in den Zellen anreichern (Abbildungen 29 bis 32).

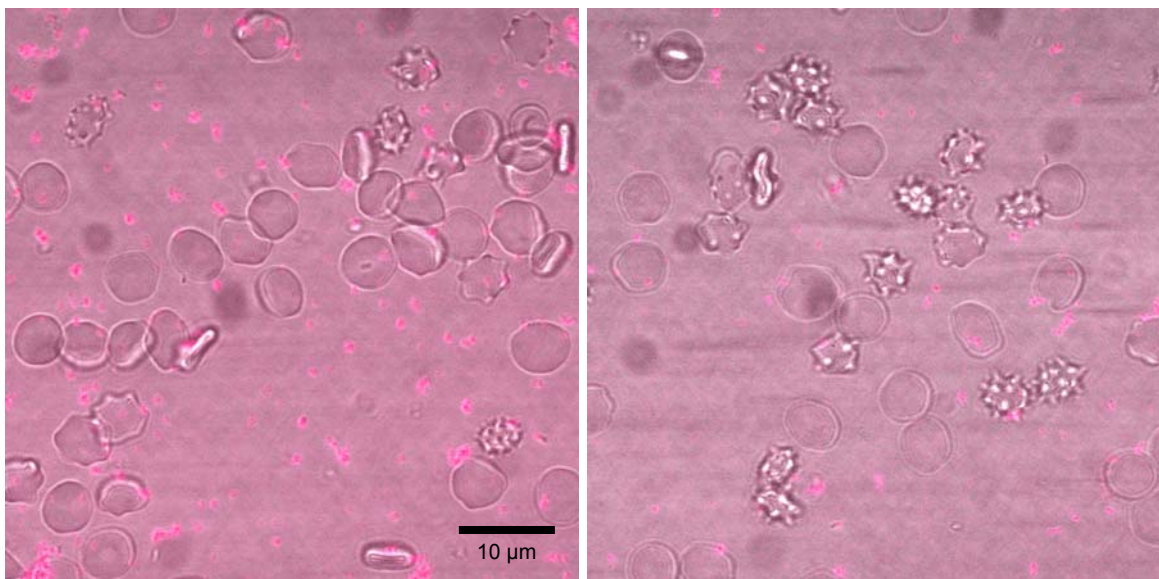


Abbildung 27: Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Erythrozyten und Fe10-D1-B (links, Vergrößerung 60x) beziehungsweise Fe10-D2-B (rechts, Vergrößerung 60x). Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei  $>650$  nm gemessen.

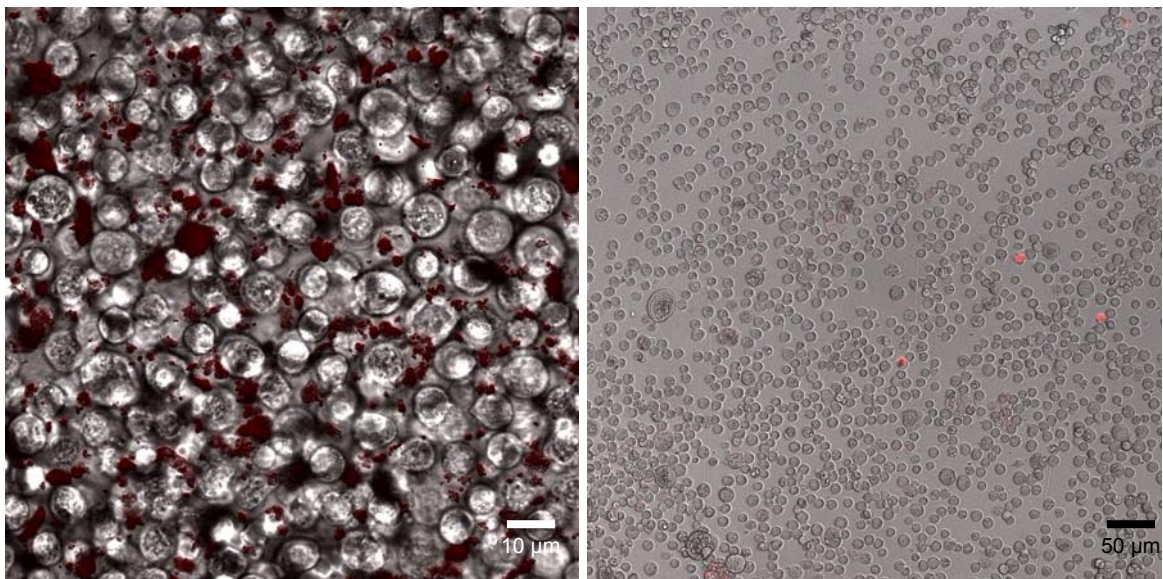


Abbildung 28: Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Caco-2-Zellen und Fe10-D1-B (links, Vergrößerung 60x) beziehungsweise Fe10-D2-B (rechts, Vergrößerung 10x). Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei >650 nm gemessen.

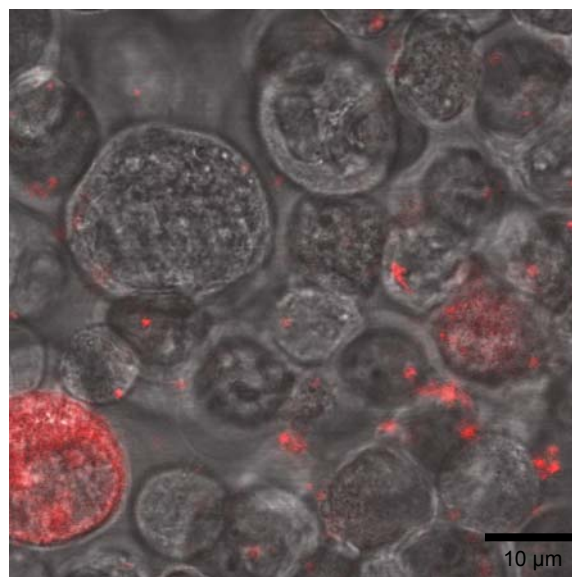


Abbildung 29: Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe10-D2-B (Vergrößerung 100x). Der Clathrin-abhängige Aufnahmemechanismus wurde mit 10 µg/ml Chlorpromazine blockiert. Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei >650 nm gemessen.



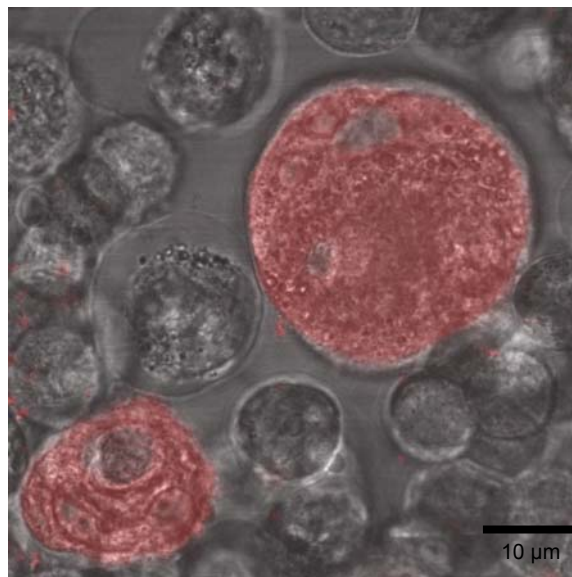


Abbildung 30: Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe10-D2-B (Vergrößerung 100x). Der Caveolin-abhängige Aufnahmemechanismus wurde mit 10 µg/ml Nystatin blockiert. Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei >650 nm gemessen.

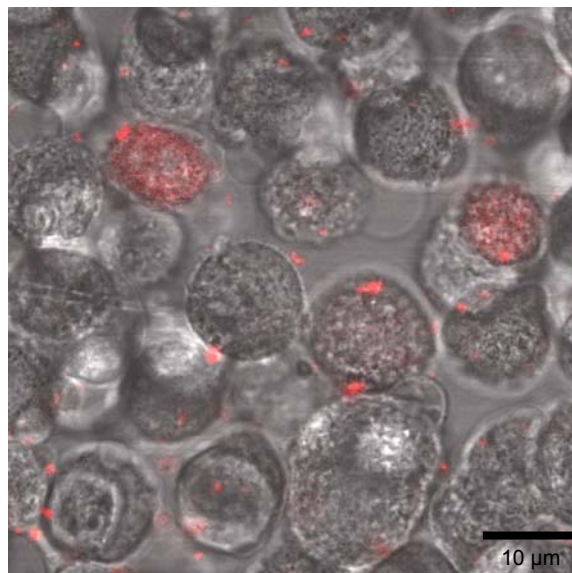


Abbildung 31: Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe10-D2-B (Vergrößerung 100x). Die Aufnahme via Phagozytose wurde mit 5 µg/ml Cytochalasin D blockiert. Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei >650 nm gemessen.

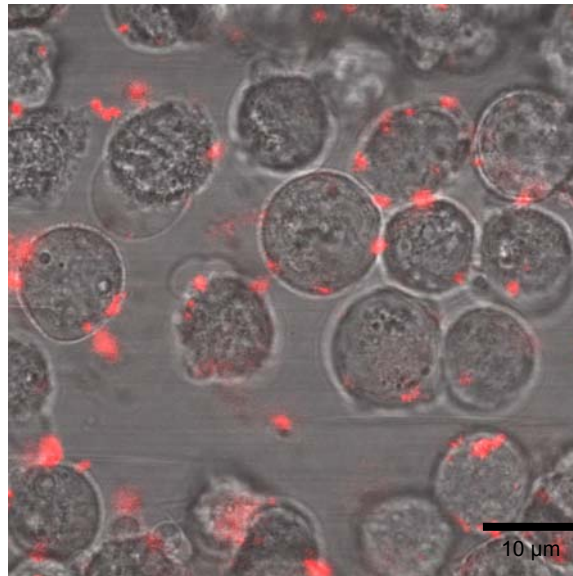


Abbildung 32: Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe10-D2-B (Vergrößerung 100x). Die Aufnahme über drei Mechanismen wurde blockiert. Es wurden entsprechende Konzentrationen (siehe Abbildungen 29 - 31) von Chlorpromazine, Nystatin und Cytochalasin D zugegeben. Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei >650 nm gemessen.

Bei allen Versuchen zur Aufnahme der Nanopartikel in Erythrozyten konnte keine Fluoreszenz und damit keine Nanopartikel in den Zellen nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zur Aufnahme der Nanopartikel in Caco-2-Zellen zeigten im Gegensatz dazu eine Fluoreszenz im Inneren von vereinzelt Zellen. Eine Blockierung der Aufnahme konnte mit den drei verwendeten Inhibitoren nicht durchgeführt werden. Inaktiviert man alle Aufnahmewege bis auf den Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Mechanismus, sind immer noch  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel in vereinzelt Zellen zu finden.



### 4.1.2 SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel

#### Intrazellulärer pH-Wert

Der intrazelluläre pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen nach der Inkubation mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln wurde analysiert. Abbildung 33 zeigt die erhaltenen Ergebnisse für Erythrozyten (schwarz) und Caco-2-Zellen (blau). In Tabelle 12 sind die erhaltenen Werte aufgelistet.

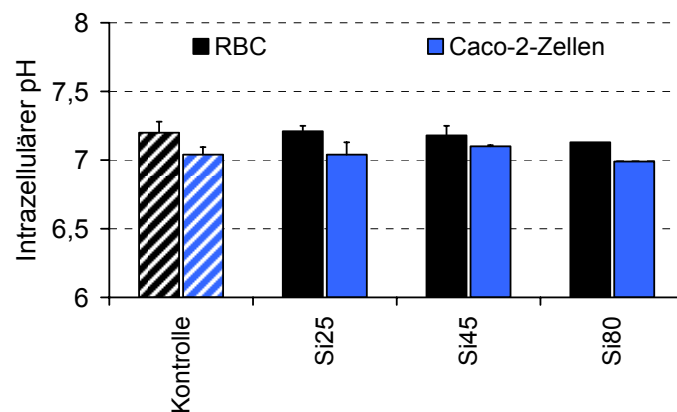


Abbildung 33: pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln. Schwarz: Erythrozyten, blau: Caco-2-Zellen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ .

Tabelle 12: Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln.

Nanopartikel	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	7,20	7,04
Si25	7,21	7,04
Si45	7,18	7,10
Si80	7,13	6,99

### Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Erythrozyten und Caco-2-Zellen nach der Inkubation mit  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln wurde am Durchflusszytometer untersucht (Abbildung 34, Tabelle 13). Es konnte kein Einfluss der Au-Nanopartikel auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der untersuchten Zellen nachgewiesen werden.

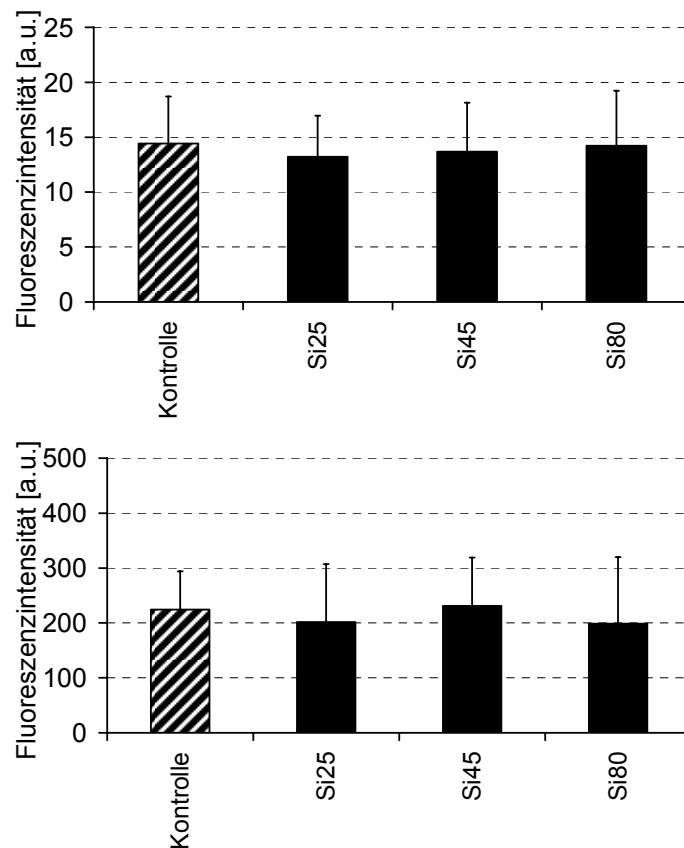


Abbildung 34: Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln. Oben: Erythrozyten, unten: Caco-2-Zellen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ .

Tabelle 13: Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln.

Nanopartikel	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	14,43	224,18
Si25	13,22	201,75
Si45	13,67	231,08
Si80	14,21	198,87

### Zytotoxizität

Die Toxizität der SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel wurde mit zwei verschiedenen Methoden analysiert. Bei Erythrozyten wurden die Exposition von PS und die Hämolyserate betrachtet. Zusätzlich wurden mit Caco-2-Zellen die beiden Zytotoxizität-Assays (LDH-Assay und XTT-Assay) durchgeführt.

#### PS-Exposition

Die Messung der Annexin-positiven Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer gemessen. In Abbildung 35 sind die Anteile an Erythrozyten aufgetragen, welche PS-Exposition zeigen.

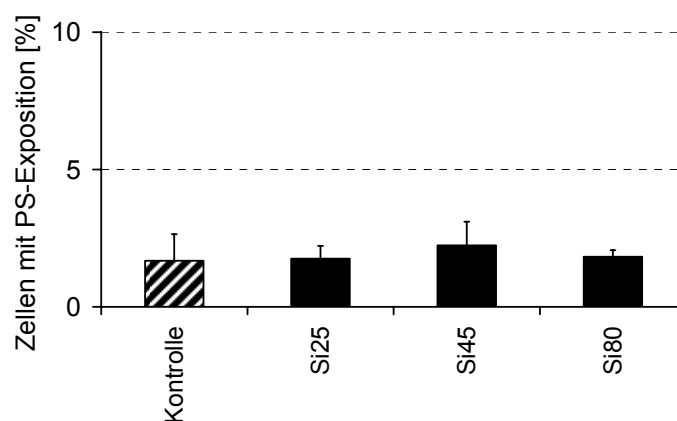


Abbildung 35: Anzahl an Erythrozyten (in %), die nach SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel-Inkubation eine PS-Exposition zeigen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4. n ≥ 3.

## Hämolyserate

Die Hämolyserate der Erythrozyten nach der Inkubation mit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln wurde mit der Drabkin-Methode ermittelt. Es ergaben sich für alle Experimente Werte von unter 2 %.

## Zytotoxizitäts-Assays

Mit dem LDH-Assay und dem XTT-Assay wurde die Zytotoxizität von SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln auf Caco-2-Zellen untersucht. Abbildung 36 zeigt die erhaltenen Werte für die toxische Aktivität der Nanopartikel.

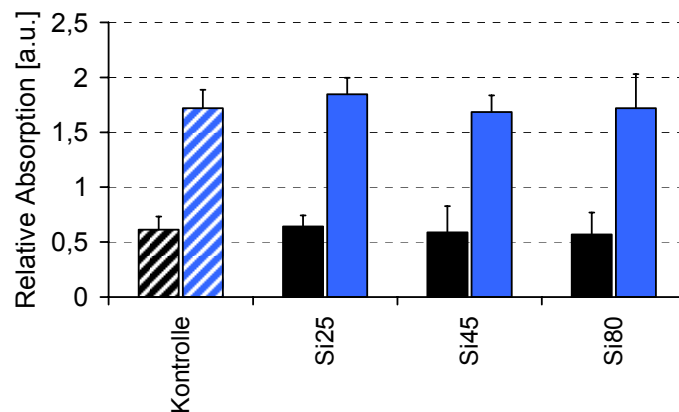


Abbildung 36: Relative Absorption der Zytotoxizitäts-Assays. Schwarz: LDH-Assay, gemessen bei 340 nm, blau: XTT-Assay, gemessen bei 492 nm. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 4.  $n \geq 3$ .

## Aufnahme von Nanopartikeln

Da an die SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel ein Fluoreszenzfarbstoff (648 nm/663 nm) gekoppelt wurde, lässt sich die Aufnahme der Nanopartikel in Erythrozyten und Caco-2-Zellen betrachten. Zur Anregung wurde Licht der Wellenlänge 633 nm verwendet, die Emission wurde bei >650 nm gemessen. Die Analyse der Erythrozyten ist in Abbildung 37 gezeigt, Abbildung 38 zeigt die Beispielfotos der Caco-2-Zellen-Analyse. In Erythrozyten ist keine Fluoreszenz zu erkennen, während Caco-2-

Zellen nach der Inkubation mit Si25 und Si45 eine deutlich sichtbare Fluoreszenz an der äußeren Zelle zeigen.

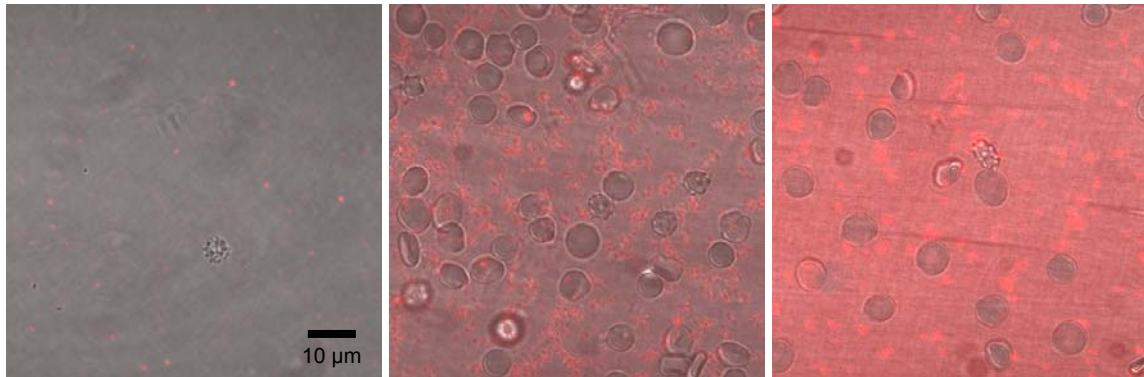


Abbildung 37: Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Erythrozyten mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln. Links: Si25, mitte: Si45, rechts: Si80). Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei >650 nm gemessen.

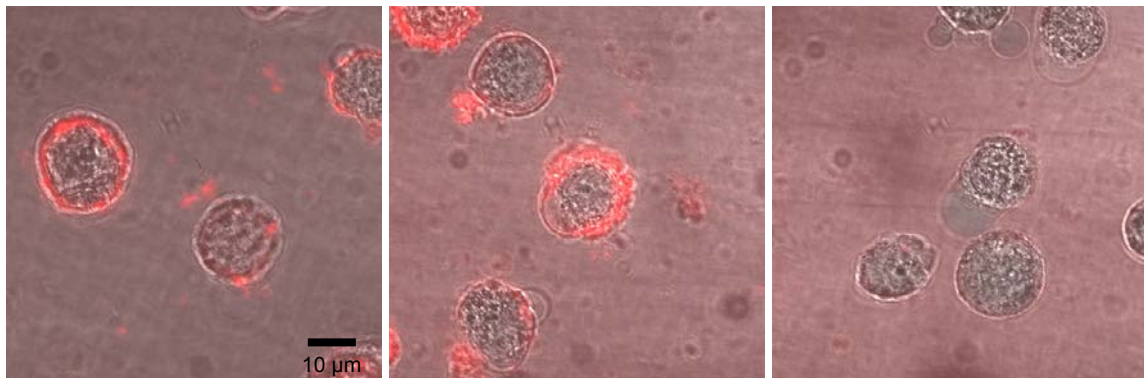


Abbildung 38: Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Caco-2-Zellen mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln. Links: Si25, mitte: Si45, rechts: Si80). Die Fluoreszenz wurde bei 633 nm angeregt, die Fluoreszenz mit einem Breitbandfilter bei >650 nm gemessen.

### 4.1.3 Au-Nanopartikel

#### Intrazellulärer pH-Wert

Au-Nanopartikel wurden in verschiedenen Größen hergestellt und auf ihren Einfluss auf den pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen untersucht (Abbildung 39, Tabelle 12). Der intrazelluläre pH-Wert von Caco-2-Zellen ist nicht signifikant verändert, der pH-Wert der Erythrozyten ist für die Nanopartikel Au18, Au25, Au30 leicht reduziert.

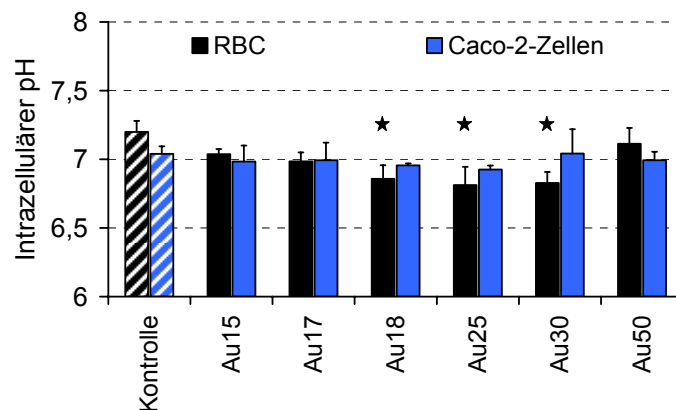


Abbildung 39: pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit Au-Nanopartikeln. Schwarz: Erythrozyten, blau: Caco-2-Zellen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 5.  $n \geq 3$ ,  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (\*).

Tabelle 12: Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit Au-Nanopartikeln.

Nanopartikel	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	7,20	7,04
Au15	7,04	6,98
Au17	6,98	6,99
Au18	6,86	6,96
Au25	6,81	6,93
Au30	6,83	7,04
Au50	7,11	6,99

### Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zellen wurde mit fluo-4 AM beobachtet (Abbildung 40). In Tabelle 13 sind die einzelnen Mittelwerte für die Fluoreszenzintensität der Zellen aufgetragen.

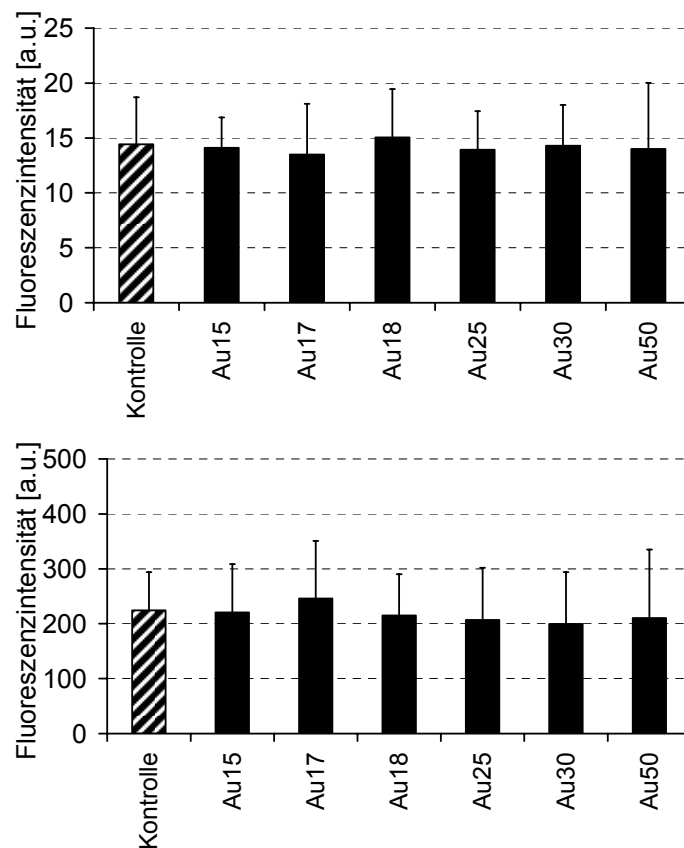


Abbildung 40: Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit Au-Nanopartikeln. Oben: Erythrozyten, unten: Caco-2-Zellen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 5.  $n \geq 3$ .

In keinem Fall konnte ein Einfluss der Au-Nanopartikel auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt festgestellt werden. Er weicht für alle Größen nicht signifikant von der Kontrolle ab.

Tabelle 15: Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit Au-Nanopartikeln.

Nanopartikel	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	14,43	224,18
Au15	14,10	220,67
Au17	13,50	245,81
Au18	15,06	214,96
Au25	13,94	206,67
Au30	14,29	199,47
Au50	14,01	210,50

### Zytotoxizität

Die Toxizität der Au-Nanopartikel wurde mit verschiedenen Methoden analysiert. Bei Erythrozyten wurden die Exposition von PS und die Hämolyserate betrachtet. Zusätzlich wurden mit Caco-2-Zellen die beiden Zytotoxizität-Assays (LDH-Assay und XTT-Assay) durchgeführt.

#### PS-Exposition

Die Analyse der PS-Exposition zeigte in allen Fällen der Inkubation mit Au-Nanopartikeln eine Expositionsrate von unter 2 %. In Abbildung 41 sind die einzelnen Werte graphisch aufgetragen.

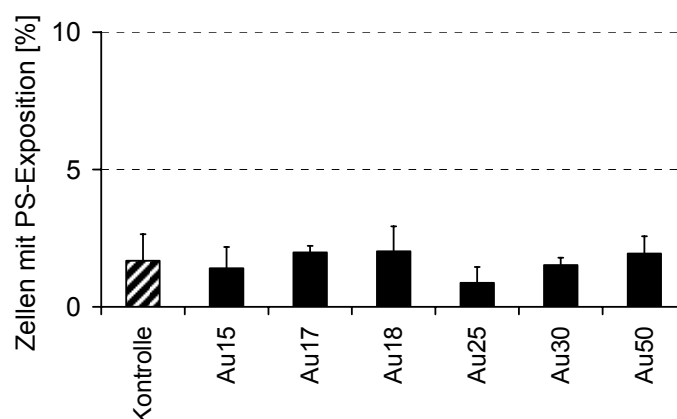


Abbildung 41: Anzahl an Erythrozyten (in %), die nach Au-Nanopartikel-Inkubation eine PS-Exposition zeigen. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 5.  $n \geq 3$ .



## Hämolyserate

Die Untersuchung der Hämolysen ergab eine Hämolyserate von weniger als 2 % der Zellen mit allen eingesetzten Nanopartikeln. Sowohl die PS-Exposition als auch die Hämolyserate zeigen keine signifikanten Effekte.

## Zytotoxizitäts-Assays

Die Zytotoxizität an Caco-2-Zellen wurde mit den beiden Tests XTT-Assay und LDH-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 aufgezeigt. Es ist kein signifikanter Einfluss detektierbar.

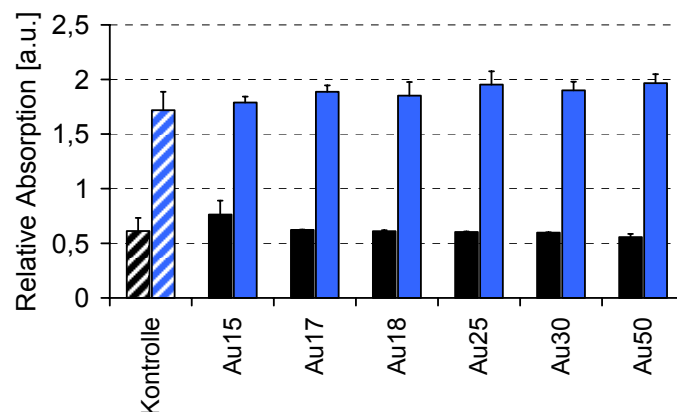


Abbildung 42: Relative Absorption der Zytotoxizitäts-Assays. Schwarz: LDH-Assay, gemessen bei 340 nm, blau: XTT-Assay, gemessen bei 492 nm. Für eine genaue Übersicht der Bezeichnung der Nanopartikel siehe Tabelle 5.  $n \geq 3$ .

## Liposomen mit Nanopartikeln

Caco-2-Zellen und Erythrozyten wurden nach der Inkubation mit fluoreszenten Nanopartikel-gefüllten Liposomen durchflusszytometrisch analysiert. Hier konnte in Erythrozyten keine Fluoreszenz nachgewiesen werden, während Caco-2-Zellen eine Fluoreszenz zeigten.

## 4.2 PU-Nanofasern

### Formveränderungen von Erythrozyten

Die hergestellten PU-Fasern wurden unter dem Mikroskop analysiert. Zur besseren Beobachtung wurden die Zellen mit fluo-4 AM wie unter 3.11.2 beschrieben angefärbt. Abbildung 43 zeigt eine Aufnahme von Erythrozyten im Sauerstoffplasma-behandelten Faserverbund. Es kommt hier zu vereinzelt lokalen Deformationen in Form von einer oder mehreren punktuellen Ausstülpungen der Membran zu den Fasern hin (gelbe Pfeile). Abbildung 44 zeigt je eine Aufnahme der beiden Fasertypen (unbehandelt und sauerstoffplasma-behandelt) mit den Erythrozyten. Hier sind in beiden Abbildungen Veränderungen in der Form sichtbar (gelbe Pfeile).

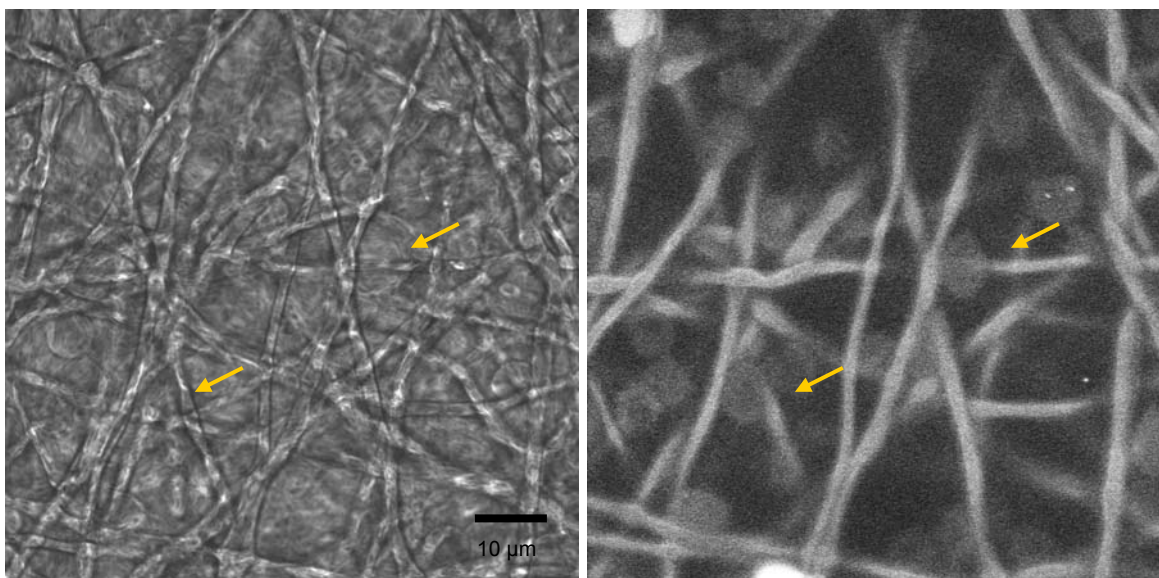


Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf sauerstoffbehandelten PU-Fasern. Links: Durchlichtmikroskopie, rechts: Fluoreszenzaufnahme bei 488 nm. Bei beiden Aufnahmen sind Formveränderungen der Erythrozyten zu sehen (gelbe Pfeile).

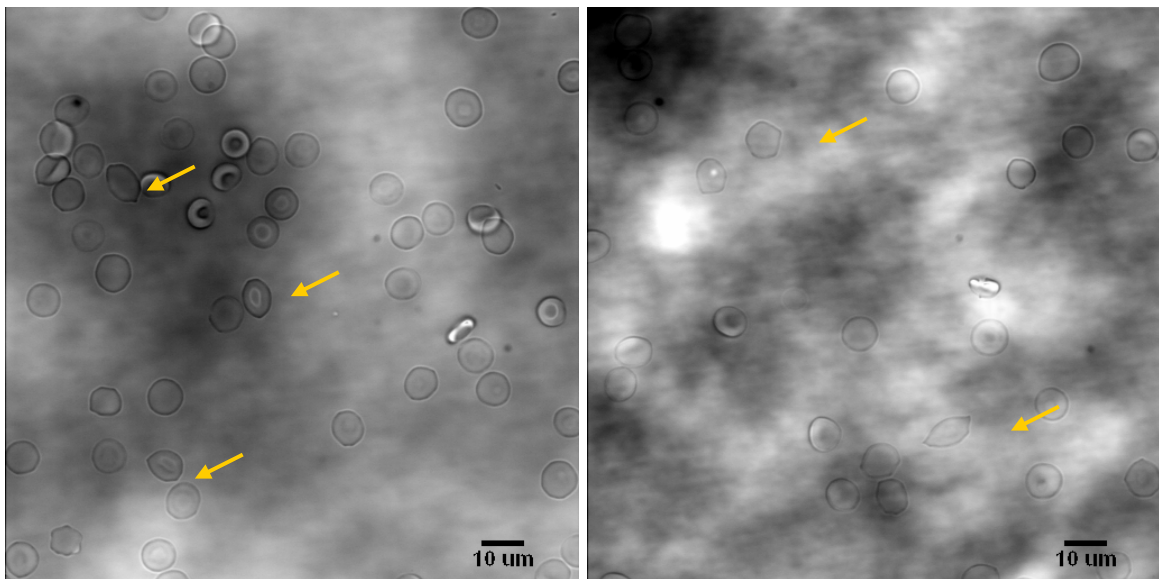


Abbildung 44: Durchlicht-Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf PU-Fasern. Links: sauerstoffbehandelte Fasern, rechts: unbehandelte Fasern. Bei beiden Aufnahmen sind Formveränderungen der Erythrozyten zu sehen (gelbe Pfeile).

### Eindring-Tiefe und -Geschwindigkeit von Erythrozyten

Abbildung 45 zeigt Aufnahmen von Erythrozyten auf unbehandelten PU-Fasern bei verschiedenen Fokustiefen (von links oben nach rechts unten: 0 (direkt über der Faser), 5, 10, 15 µm). Es konnte kein Unterschied zu den sauerstoffbehandelten PU-Fasern beobachtet werden.

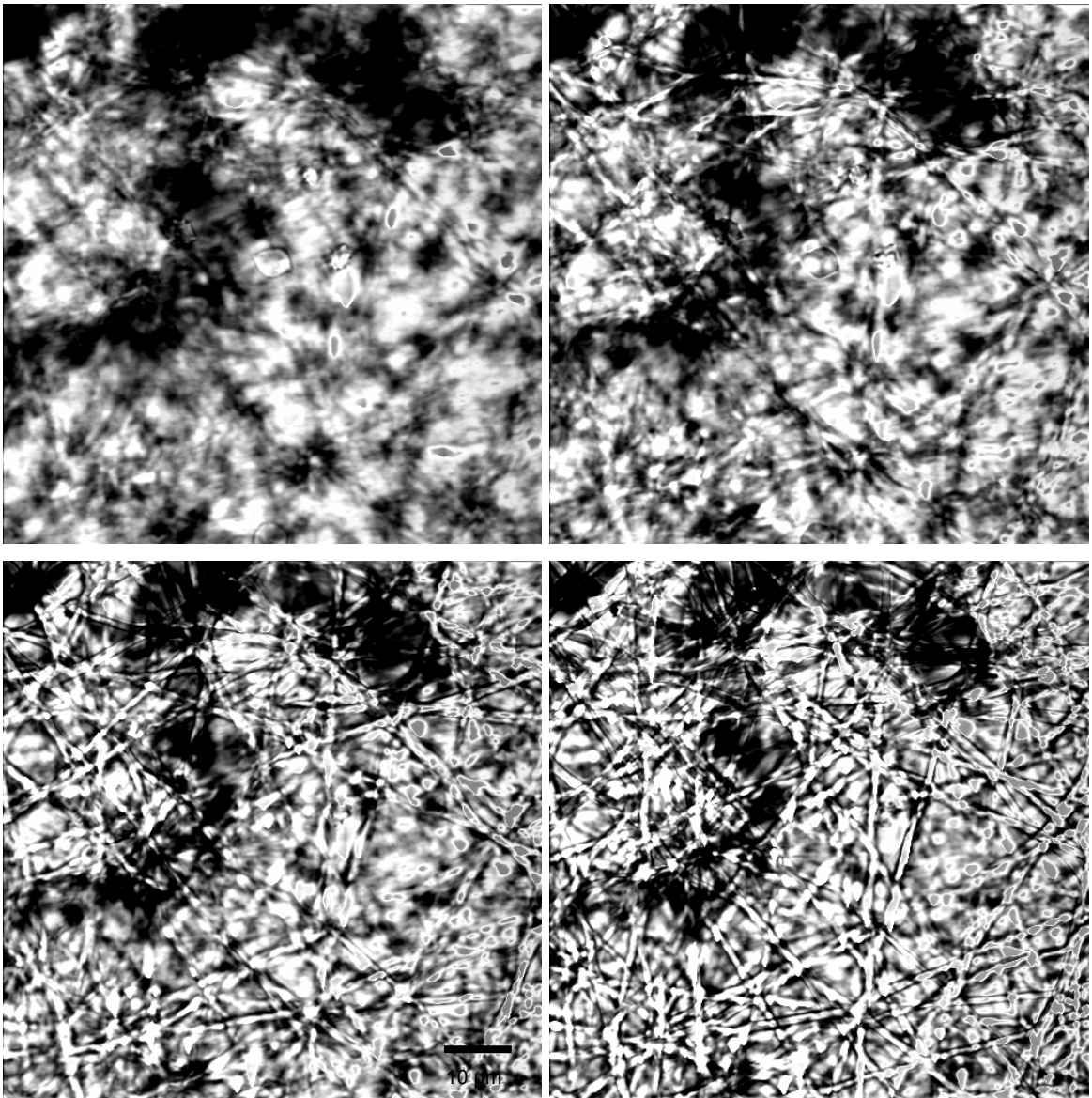
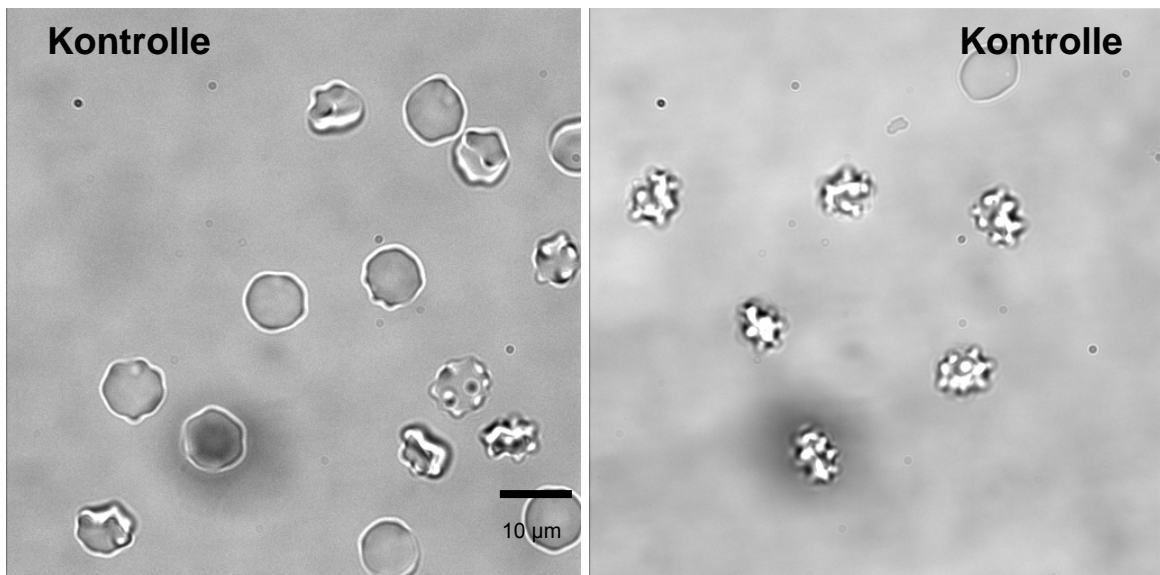


Abbildung 45: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf unbehandelten PU-Fasern, mit verschiedenen Fokustiefen. Von links oben nach rechts unten: 0 (direkt über der Faser), 5, 10, 15  $\mu\text{m}$ .

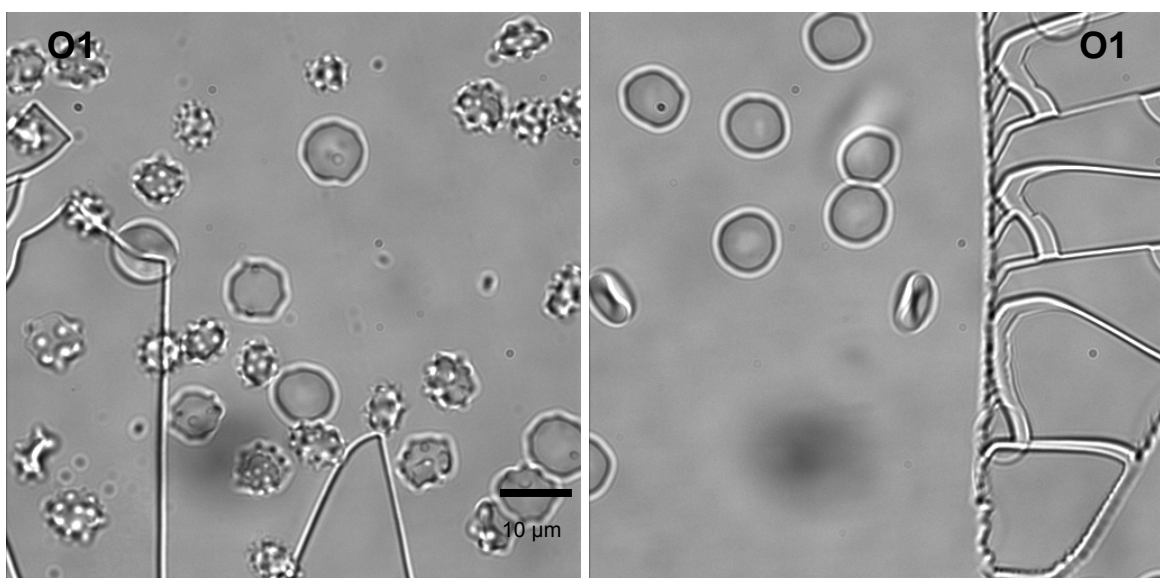
### 4.3 Nanostrukturierte Oberflächen

Nach Zugabe der Erythrozyten auf die nanostrukturierten  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen wurde deren Form und mögliche Veränderungen in der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration untersucht. Die Kontrolle (unbeschichtete Glasoberfläche) ist in

Abbildung 46 dargestellt. Abbildung 47 zeigt Erythrozyten auf der spin coated hergestellten  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche O1. Bei beiden Aufnahmen sieht man Strukturen der Oberfläche. In Abbildung 48 und 49 sind durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf dip coated hergestellten  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen O2 bis O9 dargestellt.



**Abbildung 46:** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf einer unbeschichteten Glasoberfläche. Aufnahme derselben Probe an verschiedenen Positionen.



**Abbildung 47:** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf der  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche O1 (spin coated).

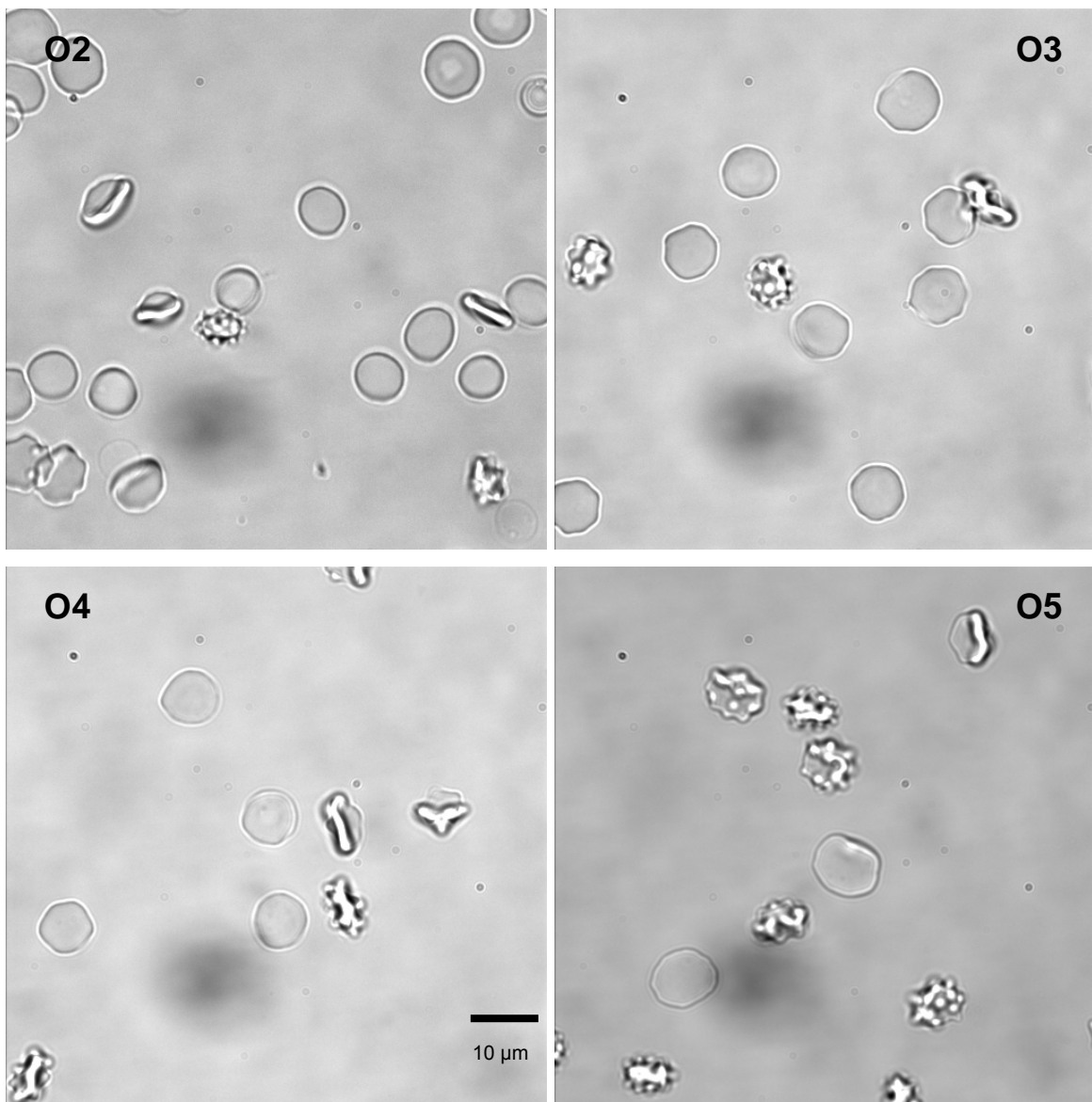


Abbildung 48: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen O2 bis O5 (dip coated).



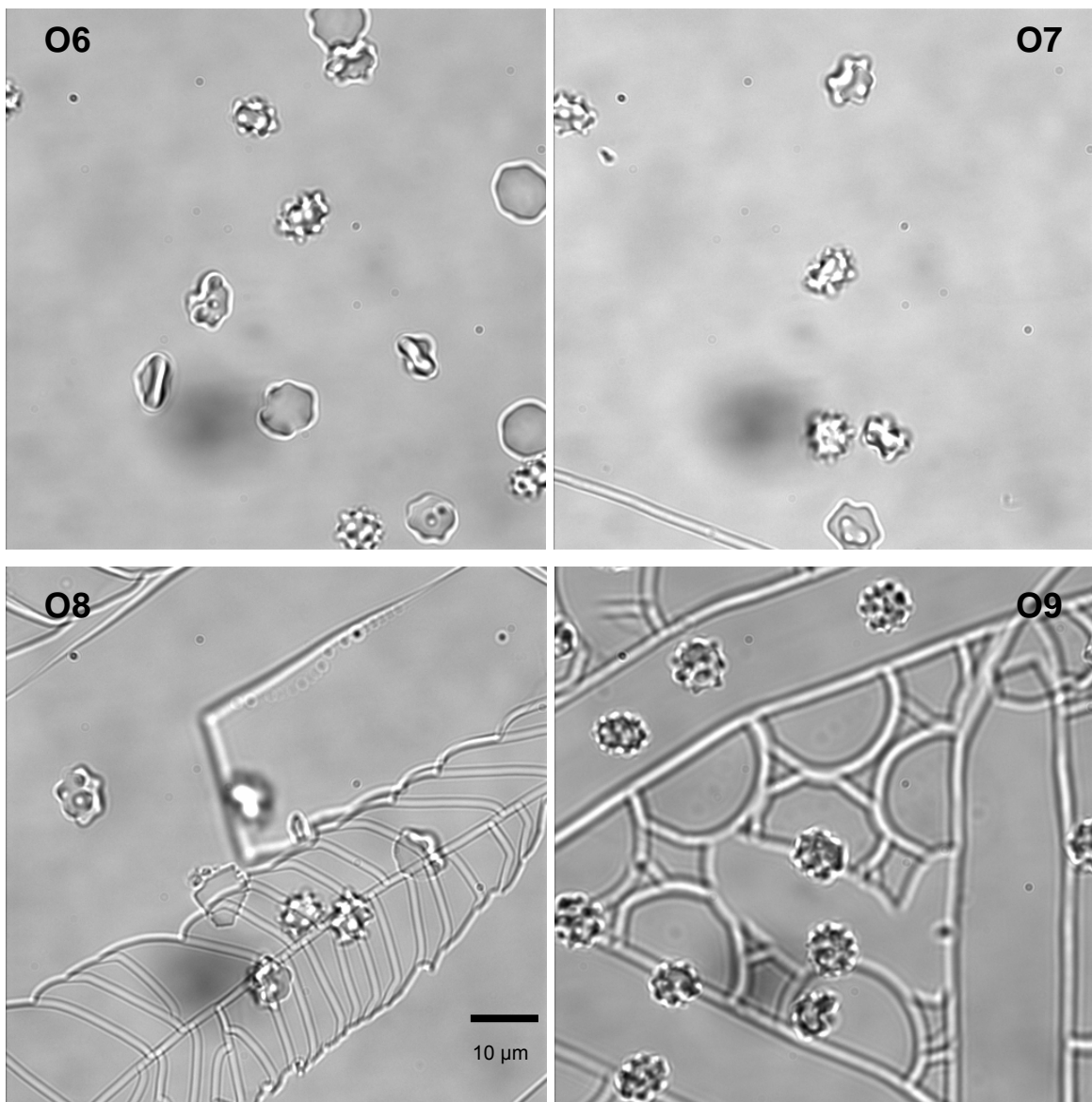


Abbildung 49: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf SiO<sub>2</sub>-Oberflächen O6 bis O9 (dip coated).

Um die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu beobachten, wurden die Zellen vor der Zugabe auf die Oberfläche mit fluo-4 AM inkubiert. Nach dem Absetzen auf die Oberfläche (5 bis 10 min) wurde die Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration über 30 min gestartet. Abbildung 50 zeigt am Beispiel der SiO<sub>2</sub>-Oberfläche O2 den Verlauf der Fluoreszenzintensität über 30 min. In Abbildung 51 sind die Endwerte nach 30 min Inkubation aufgetragen. Es zeigt sich eine geringe, aber dennoch

statistisch signifikante Erniedrigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts bei einigen Oberflächen (O2, O4, O5, O6, O7, O9).

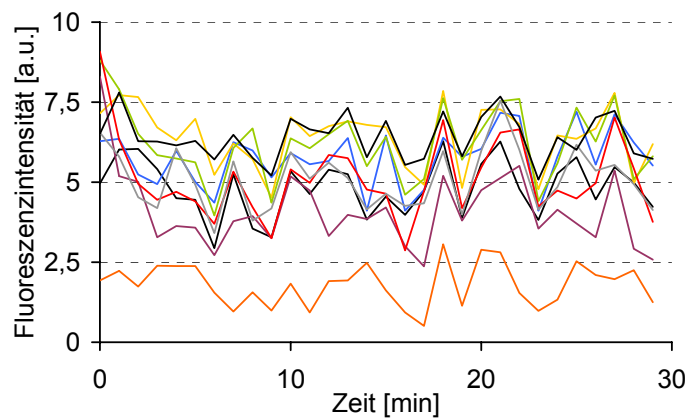


Abbildung 50: Repräsentatives Beispiel des Zeitverlaufs der Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM-markierten Erythrozyten auf der  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche, hier auf O2. Gemessen über 30 min. Jeder Graph repräsentiert eine Zelle.

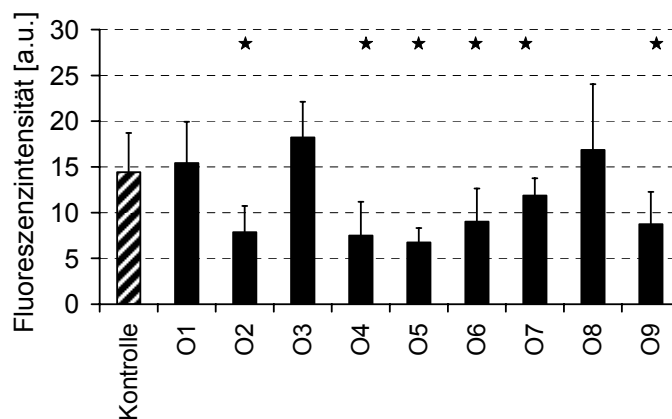


Abbildung 51: Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM-markierten Erythrozyten nach 30 min Inkubation mit  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen.  $n \geq 3$ ,  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (\*).

#### 4.4 Kohlenhydrat-synthetisierte Polypeptide

Die fluoreszierenden Polypeptide wurden auf ihre Bindungsaffinität untersucht. Neben den Galactose-, Mannose- und Glucose-haltigen Polypeptiden wurden



zusätzlich noch solche ohne gebundenen Zucker als Kontrolle für unspezifische Bindungen analysiert.

Zu Beginn der Versuche wurde die Konzentration an eingesetztem Polypeptid festgelegt. Hierzu wurden Fluoreszenzmessungen bei verschiedenen Konzentrationen (10, 20, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) durchgeführt. Optimale Fluoreszenzerggebnisse wurden bei einer Menge von 100  $\mu\text{g/ml}$  erhalten. Die einzelnen Versuchsergebnisse erreichten einen stabilen Wert, bei dem ein Unterschied zur Kontrolle leicht sichtbar ist.

Die analysierten Polypeptide PP1 bis PP4 sind in Abbildung 52 bis 55 durchlicht- und fluoreszenzmikroskopisch analysiert worden. In Tabelle 16 sind die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten aufgelistet.

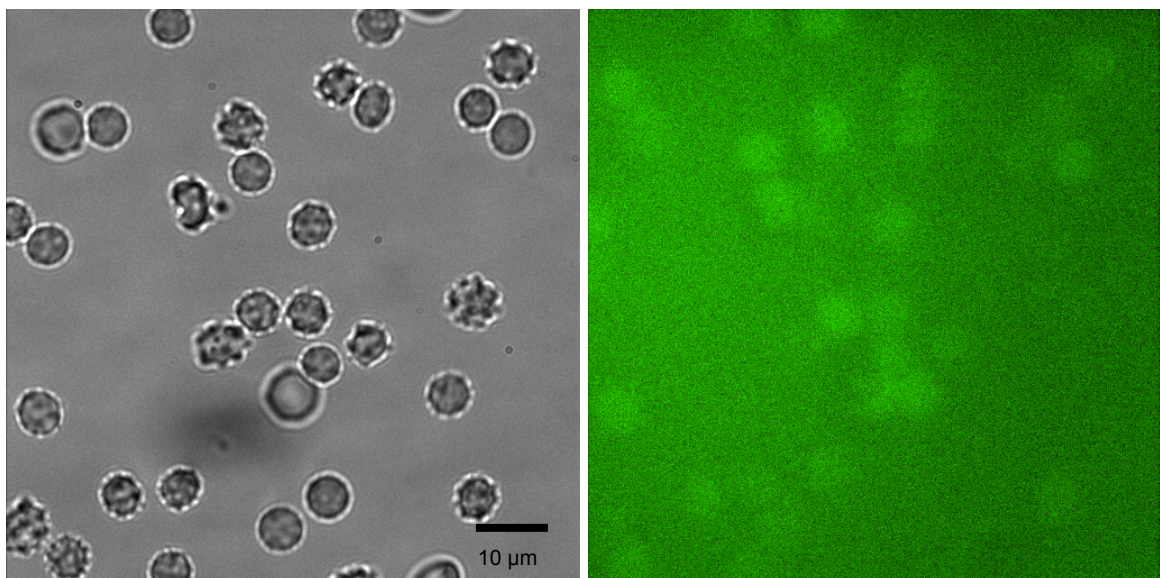


Abbildung 52: Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP1. Links: Durchlichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Fluoreszenzaufnahme.

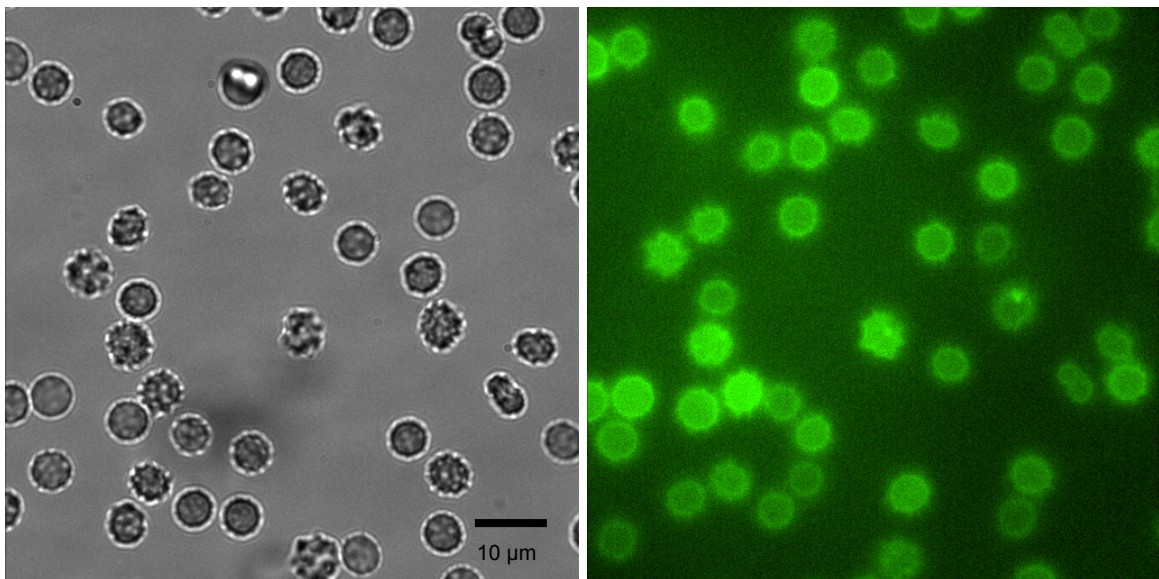


Abbildung 53: Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP2. Links: Durchlichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Fluoreszenzaufnahme.

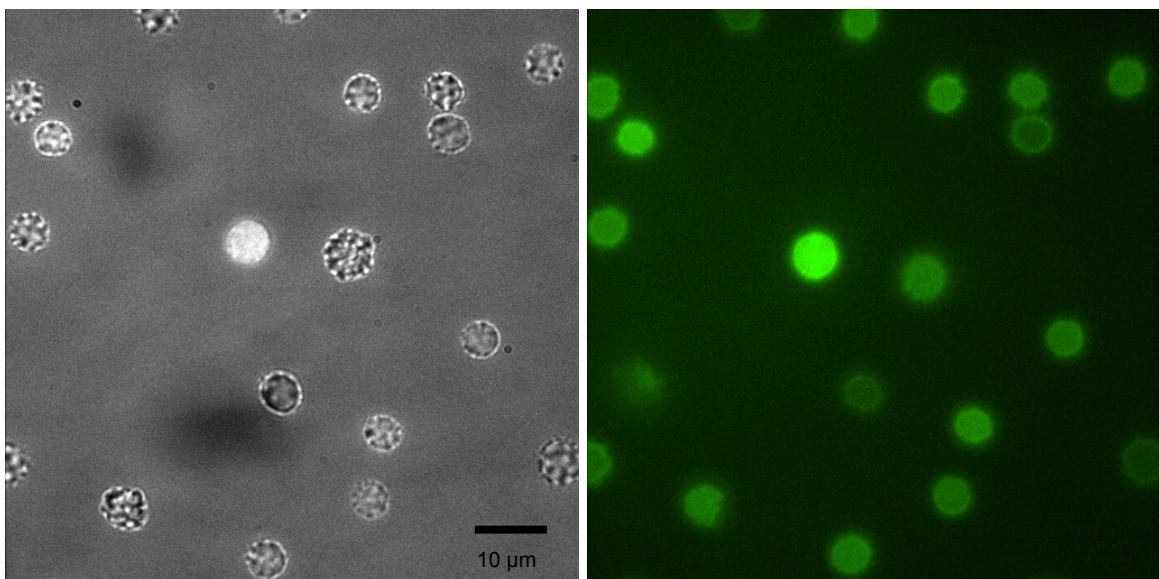


Abbildung 54: Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP3. Links: Durchlichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Fluoreszenzaufnahme.

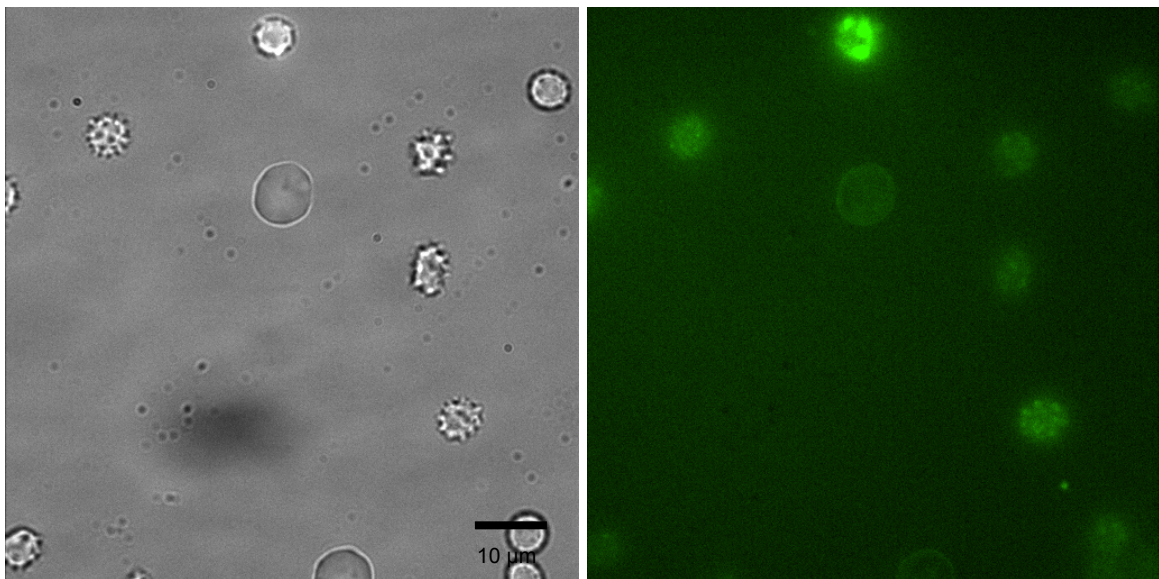


Abbildung 55: Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP4. Links: Durchlichtmikroskopische Aufnahme, rechts: Fluoreszenzaufnahme.

Tabelle 16: Fluoreszenzintensität (Mittelwerte) der Erythrozyten nach Inkubation mit den Polypeptiden.

Bezeichnung	Zucker	Fluoreszenzintensität
PP1	-	5,91
PP2	Galactose	103,45
PP3	Mannose	34,63
PP4	Glucose	50,97

Abhängig vom gebundenen Zucker verändert sich die Fluoreszenzintensität und damit der Bindung der Polypeptide an Erythrozyten. Während die Erythrozyten bei den Polypeptiden ohne Zucker (PP1) keine erhöhte Fluoreszenz zeigen, steigt sie über PP3 und PP4 hin zu PP2 kontinuierlich an.

#### 4.5 Fluoroalkylierte Phosphate

Ursprünglich war im EU-Projekt NanoMagDye vorgesehen, fertige Mikrobläschen zur Bindung an Nanopartikel herzustellen. Zum aktuellen Zeitpunkt konnten diese Mikrobläschen aufgrund ihrer Stabilität noch nicht hergestellt und untersucht

werden. Diese Stabilität ist ein wichtiger Grund, warum auch die einzelnen Moleküle, aus denen die Bläschen aufgebaut sind, betrachtet werden müssen.

Die vier vorliegenden fluoroalkylierten Phosphate wurden auf ihren Einfluss auf den pH-Wert und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von Erythrozyten und Caco-2-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde betrachtet, ob sie eine zytotoxische Wirkung besitzen. Hierfür wurden die Hämolyserate und die PS-Exposition von Erythrozyten analysiert. Eingesetzt wurde eine Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$ . Diese Menge entspricht der vorgesehenen Konzentration in der medizinischen Applikation.

### Intrazellulärer pH-Wert

Der pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen nach Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten wurde mit dem Farbstoff BCECF AM am Fluoreszenzspektrometer bestimmt. In Abbildung 56 ist der pH-Wert der Zellen aufgetragen. Die Werte sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

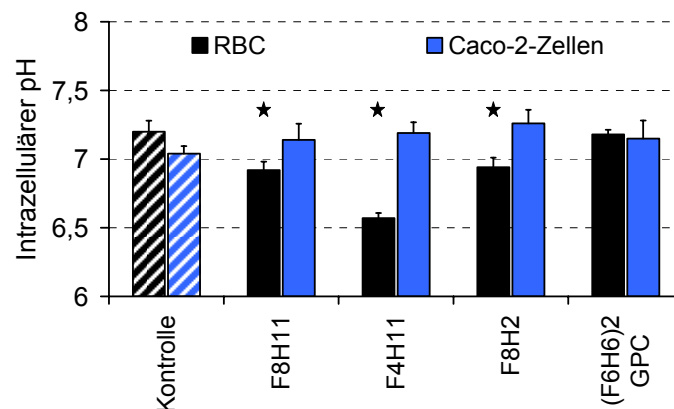


Abbildung 56: pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten. Schwarz: Erythrozyten, blau: Caco-2-Zellen.



Tabelle 17: Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten.

	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	7,20	7,04
F8H11	6,92	7,14
F4H11	6,57	7,19
F8H2	6,94	7,26
(F6H6) <sub>2</sub> GPC	7,18	7,15

Die pH-Werte sind für Erythrozyten nach der Inkubation mit den drei einzelkettigen Molekülen reduziert. Ein Vergleich mit dem nicht-fluorinierten Molekül (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OP(O)(OH)<sub>2</sub> zeigte keine Änderung zur Kontrolle (Daten nicht dargestellt).

#### Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt der Zellen nach Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten wurde mit fluo-4 AM am Durchflusszytometer bestimmt. In Abbildung 57 und Tabelle 18 sind die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Experimente aufgetragen.

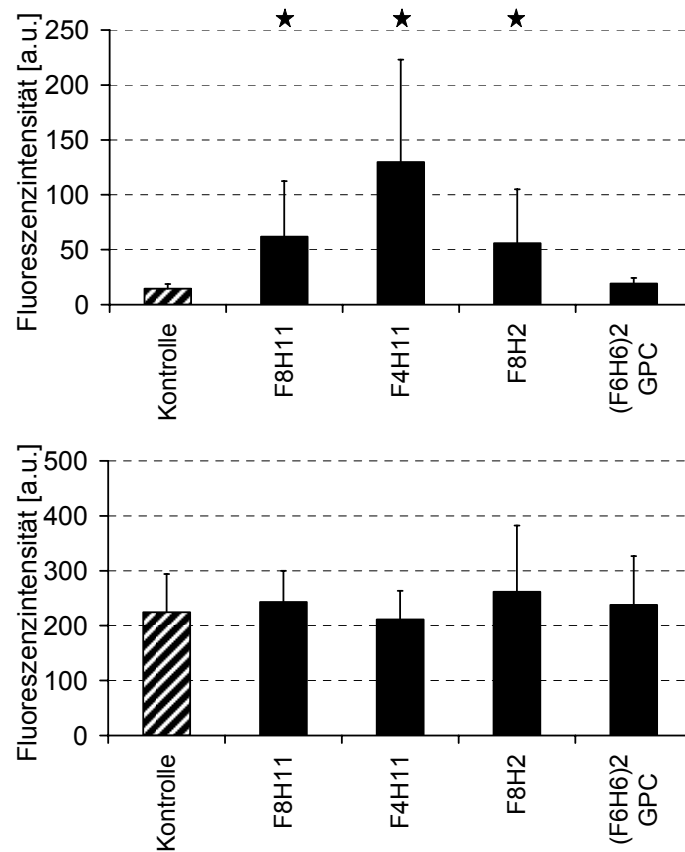


Abbildung 57: Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten. Oben: Erythrozyten, unten: Caco-2-Zellen.  $n \geq 3$ ,  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (\*).

Tabelle 18: Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten.

	Erythrozyten	Caco-2-Zellen
Kontrolle	14,43	224,18
<i>F8H11</i>	61,85	243,00
<i>F4H11</i>	129,77	211,38
<i>F8H2</i>	55,80	261,73
( <i>F6H6</i> ) <sub>2</sub> GPC	19,20	237,80

Wie bei pH-Wert ist auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrozyten nach der Inkubation mit den drei einzelkettigen Molekülen erhöht. Ein Vergleich mit dem nicht-fluorinierten Molekül ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ) zeigte keine Änderung zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Im Laufe der Analyse der Zellen im Durchflusszytometer wurde festgestellt, dass die Anzahl der gemessenen Zellen pro Sekunde reduziert ist. Während bei gleich bleibenden Einstellungen die Kontrolle bei etwa 1000 Zellen pro Sekunde gemessen wurde, ist die Zahl der gemessenen Zellen nach der Inkubation mit den verschiedenen fluoroalkylierten Phosphaten auf unter 10 pro Sekunde gefallen.

### **Zytotoxizität**

Im Anschluss an die beobachteten Rückgänge der Zellzahl im Durchflusszytometer nach der Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten wurden diese auf ihre Zytotoxizität gegenüber roten Blutzellen überprüft. Hierfür wurden die PS-Exposition der Erythrozyten und die Hämolyserate betrachtet.

#### PS-Exposition

FITC annexin V-positive Zellen wurden nach der Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten am Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 58 zeigt den Anteil an positiv markierten Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellmenge. Bei allen getesteten Molekülen zeigt sich eine Veränderung. Ein Vergleich mit dem nicht-fluorinierten Molekül ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ) zeigte keine Änderung zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

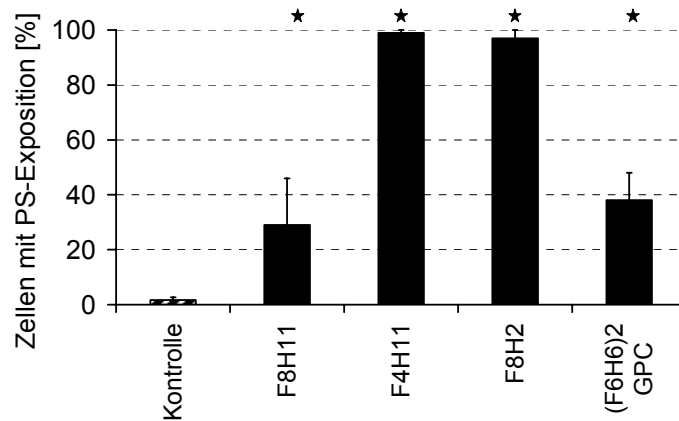


Abbildung 58: Anzahl an Erythrozyten (in %), die nach Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten eine PS-Exposition zeigen.  $n \geq 3$ ,  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (\*).

#### Hämolyserate

Die Messung der Hämolyserate wurde nach Drabkins durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 59 aufgetragen. Die Hämolyserate ist stark erhöht für die drei einzelkettigen Moleküle. Ein Vergleich mit dem nicht-fluorinierten Molekül ( $C_{12}H_{25}OP(O)(OH)_2$ ) zeigte keine Änderung zur Kontrolle (Daten nicht dargestellt).

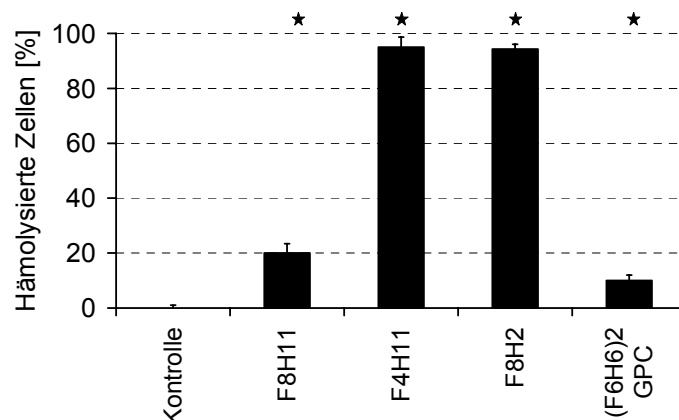


Abbildung 59: Anteil der hämolysierten Erythrozyten (in %) nach Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten.  $n \geq 3$ ,  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (\*).



#### 4.6 Messung des Membranpotenzials von Erythrozyten

Zusätzlich zu den oben genannten Untersuchungen des Einflusses von Nanopartikeln auf Zellen wurde das Membranpotenzial von Erythrozyten untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Teilaspekt in der Grundlagenforschung an Erythrozyten. Bisher ist unklar, wie schnell sich das Membranpotenzial der Zellen ändert, wenn sich die Ionenstärke des umgebenden Mediums verringert, man die Zellen also in eine Lösung mit geringer Ionenstärke transferiert.

Das Membranpotenzial der Zellen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) am Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 60 zeigt zur Verdeutlichung der Anreicherung des Farbstoffs in der Zellmembran eine typische fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von angefärbten Erythrozyten. Die erhöhte Fluoreszenzintensität an der Zellmembran ist deutlich zu erkennen.

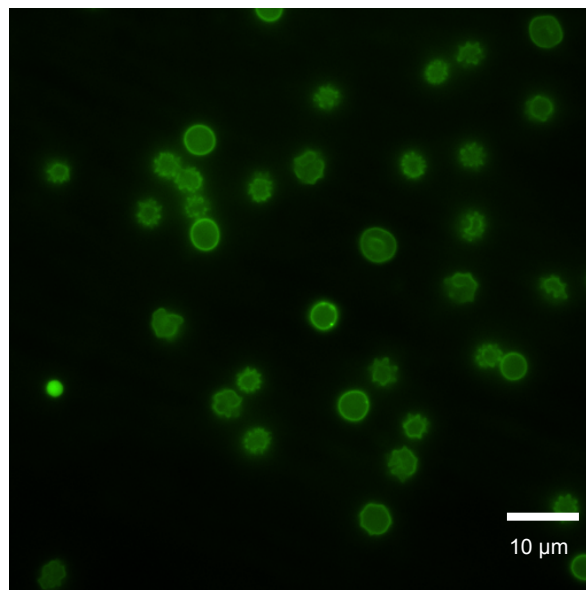


Abbildung 60: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbten Erythrozyten.

Es wurde die Fluoreszenz der Zellen beim Wechsel von physiologischem Medium in Medium mit niedriger Ionenstärke (LIS200 beziehungsweise LIS250)

gemessen. In Abbildung 61 sind die erhaltenen Fluoreszenzwerte über eine Zeit von 30 min aufgetragen.

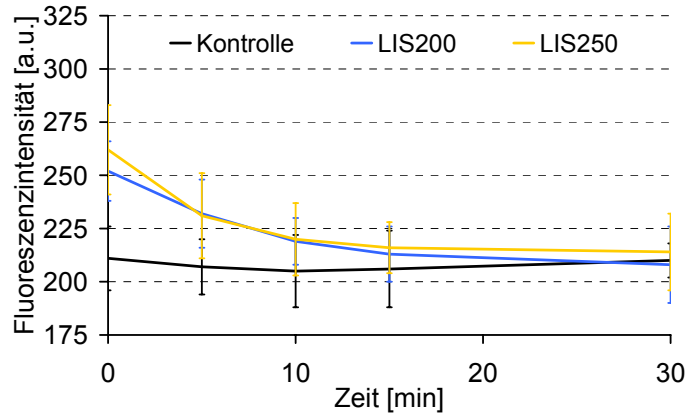


Abbildung 61: Fluoreszenzintensitäten (Mittelwerte) von mit DiBAC<sub>4</sub>(3) inkubierten Erythrozyten. Der Mediumwechsel von physiologischem Medium auf LIS200 beziehungsweise LIS250 erfolgte bei t = -15 Sekunden. Als Kontrolle wurden die Werte in einer physiologischen Lösung ermittelt.

Eine Kalibration des Membranpotenzials konnte nur teilweise durchgeführt werden. Inkubiert man Erythrozyten mit Valinomycin, einem spezifischen K<sup>+</sup>-Ionophor, lässt sich durch entsprechende Lösungen mit veränderter K<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup>-Konzentration ein Gleichgewicht zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Ionenkonzentration herstellen. Über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (1) lassen sich anschließend die Membranpotenzial-Werte errechnen und mit den im Durchflusszytometer gemessenen Werten vergleichen (Abbildung 62). Da man mit Valinomycin bei maximaler K<sup>+</sup>-Konzentration von 150 mM (und 0 mM NaCl bei isotonischen Verhältnissen) rechnerisch nur Potenziale von maximal 10 mV erreicht, wurde nach einem für Na<sup>+</sup> spezifischen Ionophor gesucht. Mit SQI-Pr (spezifisch für Na<sup>+</sup> zu K<sup>+</sup> im Verhältnis 1:1000) lässt sich ein errechnetes Membranpotenzial von 65 mV (bei maximaler Na<sup>+</sup>-Konzentration von 150 mM und 0 mM K<sup>+</sup>) erreichen. Hier steigen die Werte für die Fluoreszenz von DiBAC<sub>4</sub>(3) jedoch nicht wie erwartet an, sondern fallen ab (Abbildung 63). Deshalb kann eine Kalibrierung nur im negativen Membranpotenzialbereich durchgeführt werden. Das Membranpotenzial für die Kontrolle lässt sich mit der

angegebenen Valinomycin-Kalibrierung bei -10 mV bestimmen. Da die ermittelten Fluoreszenzen nach dem Transfer der Zellen in LIS200 beziehungsweise LIS250 zu Beginn erhöht sind, lässt sich darauf schließen, dass das Membranpotential ebenfalls ansteigt.

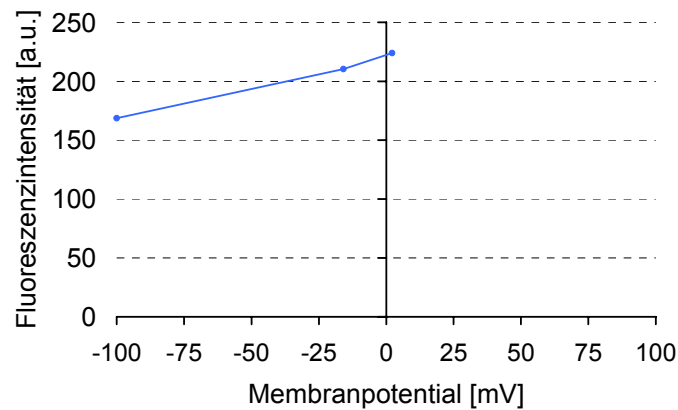


Abbildung 62: Kalibrationsgerade von mit Valinomycin inkubierten und DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbten Erythrozyten.

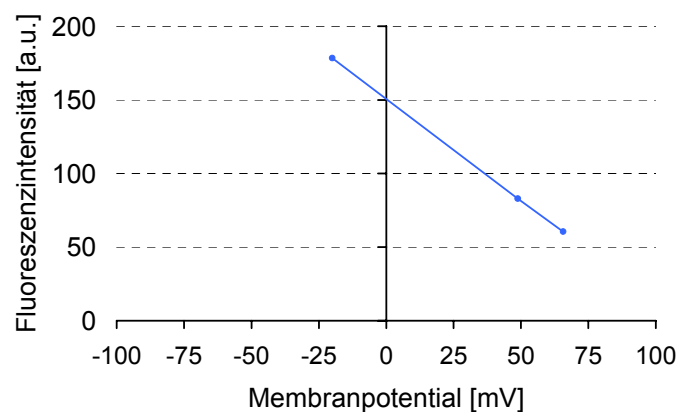


Abbildung 63: Kalibrationsgerade von mit SQI-Pr inkubierten und DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbten Erythrozyten.

## 5. Diskussion

### 5.1 Nanopartikel

Nanopartikel besitzen aufgrund ihrer Größe von typischerweise unter 100 nm besondere Eigenschaften, die sich von den chemischen und physikalischen Eigenschaften von größeren Partikeln oder Körpern gleicher Materialien stark unterscheiden können. So kann es durch die große Oberfläche zu einer verhältnismäßig größeren chemischen Reaktivität kommen, Massekräfte nehmen in ihrem Einfluss ab, während Oberflächenkräfte wie die Van-der-Waals-Kraft einen stärkeren Einfluss haben. Ebenso steigt die Intensität von Oberflächenladung und thermodynamischen Effekten (Braunscche Molekularbewegung) (Israelachvili, 2011).

#### 5.1.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel

##### Intrazellulärer pH-Wert

Der pH-Wert der Erythrozyten variiert zwischen 6,80 und 7,26. Bei den reinen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe steigt der pH von 6,80 mit steigender Größe auf 7,26 an, welches im Normbereich des physiologischen pH von Erythrozyten liegt. Fe<sub>10</sub> unterscheidet sich noch signifikant von der Kontrolle. Die mit Citrat beziehungsweise Dendrimer D1 graftedeten Nanopartikel von 10 nm Größe zeigen wie die reinen Nanopartikel einen Unterschied im intrazellulären pH-Wert bezogen auf die Kontrolle. Der pH-Wert ist bei den graftedeten Nanopartikeln bei 7,03 beziehungsweise 6,92. Bei den Caco-2-Zellen verändert sich der pH-Wert in keinem Fall signifikant. Er pendelt zwischen pH 6,99 und pH 7,08. Auch für die mit Farbstoff und Dendrimer graftedeten Nanopartikel ergibt sich keine Änderung (Tabelle 10).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich mit steigender Größe der Effekt reduziert, ebenso kann mit einer Umhüllung des Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Kerns (Grafting) der Effekt verringert

werden. Dies lässt Rückschlüsse zu, dass der  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel aufgrund seines kleinen Kerns von 10 nm Größe einen Einfluss auf die Zellen ausübt. Dieser Einfluss könnte sich darauf zurückführen lassen, dass Erythrozyten ihren intrazellulären pH-Wert sehr schnell und effizient regeln können. Jeder Erythrozyt besitzt  $10^6$  Kopien des Bänder 3-Proteins, welches für den Gasaustausch ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) verantwortlich ist und daneben noch einige andere Proteine für die pH-Regulation wie den  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ -Austauscher (Knauf und Pal, 2003; Nikinmaa, 2003). Vor allem das Bänder 3-Protein lässt sich aufgrund seiner großen Menge einen substantiellen Bereich der äußeren Zellmembran-Oberfläche (Betz et al., 2007) durch Substanzen und Nanopartikel leicht beeinflussen. Obwohl  $\text{HCO}_3^-$  nicht explizit zu den verwendeten Puffern und Lösungen gegeben wurde, sollte sich genug davon (durch gelöstes  $\text{CO}_2$  aus der Luft) in den Lösungen angereichert haben, damit der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher voll funktionsfähig ist. Zusätzlich kann das Bänder 3-Protein auch als  $\text{Cl}^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher operieren, weshalb  $\text{HCO}_3^-$  in der Regel nicht dazugegeben werden muss, wenn der Membrantransport von Erythrozyten untersucht wird (Knauf und Pal, 2003). Wie die Versuche zeigten, scheinen besonders kleine  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikel diese Proteine zu beeinflussen.

Der pH-Wert von Caco-2-Zellen wurde in keinem Fall verändert. Diese können sich im Gegensatz zu Erythrozyten auf Veränderungen in der Umgebung besser einstellen, da Synthese und Stoffwechsel nicht eingeschränkt sind.

Zur Analyse des pH-Werts ist anzumerken, dass ein mögliches Quenching der Fluoreszenz die Werte nach der Zugabe von Nanopartikeln leicht reduzieren kann, da die Fluoreszenz der Zellsuspension zusammen mit den Nanopartikeln gemessen wird. Es lässt sich keine Trennung der Partikel von den Erythrozyten mit physikalischen Methoden durchführen. Einen möglichen Hinweis darauf gibt der selbst nach 30 min noch veränderte pH-Wert, der sich in der Regel innerhalb weniger Sekunden anpasst und dann wieder einstellt (vergleiche 4.6).

### **Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration**

Die Fluoreszenz der mit fluo-4 AM inkubierten Zellen und damit der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt verändern sich im Vergleich zur Kontrolle nicht, nachdem die Zellen mit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln in Kontakt gekommen sind (Tabelle 11). Die in Abbildung 19 verglichenen Chargen von hergestellten NP10-D1-B zeigten eine unterschiedliche Reaktion. Während in der rechten, neuen Probe auch nach längerem Stehen lassen (hier 2 Stunden) die Nanopartikel in Suspension bleiben, haben sich in der 4 Wochen alten Probe links die Nanopartikel am Grund des Gefäßes abgesetzt. Zusätzlich hat sich das Patent Blau V von den Nanopartikeln getrennt, was man an der Blaufärbung der Lösung sehen kann. Eine schnelle Verarbeitung der Nanopartikel nach der Herstellung ist also dringend zu empfehlen, da die einzelnen, abgelösten Substanzen unterschiedliche Reaktionen hervorrufen können. Ebenso ist nicht mehr gewährleistet, dass die Substanzen zu ihren Zielorten gelangen, sollte sich mit dem Patent Blau V auch das gebundene Dendrimer gelöst haben.

### **Zytotoxizität**

Die PS-Exposition von Erythrozyten wird von 1,95 - 7,10 % der Zellen zur Außenseite der Membran gebracht, der Wert für die Kontrolle liegt bei 1,68 %. Zwar steigt die Exposition bei Fe40 signifikant an, dies bewegt sich aber noch in einem physiologischen Rahmen (Abbildung 25). Es konnte keine Hämolyse von Erythrozyten nachgewiesen werden.

Die Erythrozyten zeigten nach der Einwirkung von Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln keine Hämolyse (<2%). Obwohl gerade die Werte für die PS-Exposition zum Teil signifikant von der Kontrolle abweichen, ist eine Expositionsrate von <10% bei geringen Hämolysewerten noch nicht als problematisch einzustufen.

Die ermittelten Werte des LDH-Assays mit Caco-2-Zellen für die Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel unterscheiden sich nicht von der Kontrolle, beim XTT-Assay gibt es

einen geringen Unterschied der Nanopartikel von 10, 20 und 30 nm (Abbildung 26). Hier ist der Wert leicht erhöht. Eine Erhöhung des Wertes des XTT-Assays bedeutet einen vermehrten Umsatz des Tetrazolium-Salzes und damit eine höhere Viabilität der Zellen. Diese leichte Erhöhung bedeutet somit keine Toxizität an Zellen.

### **Mikroskopische Beobachtungen von Einzelzellen und Aufnahme von Nanopartikeln**

Beide Nanopartikel (Fe10-D1-B und Fe10-D2-B) sind mit dem bloßen Auge sichtbar, Fe10-D1-B bildet besonders große Aggregate (>10 µm), was eine Aufnahme in Caco-2-Zellen verhindert. Fe10-D2-B bildet nur teilweise sehr viel kleinere Aggregate und wird, wie in Abbildung 28 rechts zu sehen ist, in vereinzelte Zellen aufgenommen.

Bei der Analyse von Einzelzellen konnte keine Aufnahme von den beiden farbstoffmarkierten Nanopartikeln Fe10-D1-B und Fe10-D2-B in Erythrozyten festgestellt werden. Dies ist konform mit der Annahme, dass Nanopartikel die Membran von Zellen nicht passiv durchdringen können, da weitere Aufnahmemechanismen für Erythrozyten nicht bekannt sind. Bisher lassen sich aus der Literatur lediglich einige wenige Quellen finden, bei denen Nanopartikel im Inneren von Erythrozyten gefunden wurden [Quelle Rotis-Ruthenhauser, Geiser]. Hier ist jedoch der genaue Mechanismus der Aufnahme noch nicht bekannt.

Fe10-D1-B zeigt gerade in Zusammenhang mit (physiologischen) Salz-Lösungen eine starke Aggregation. Im Versuch zu Abbildung 27 links wurden die Nanopartikel entfernt, da sie, wie man auch in Abbildung 28 erkennen kann, zu Aggregaten der Größe der Caco-2-Zellen sich zusammenlagern können. Die Aggregation im Fall von Fe10-D2-B ist deutlich geringer. Hier sind nur noch vereinzelte Spots mit einer geringen Fluoreszenz sichtbar. Daneben zeigen einige

wenige Zellen in ihrem Inneren eine deutliche Fluoreszenz, welche auf eine Aufnahme der Partikel schließen lässt.

Die Untersuchung, welcher Aufnahmeweg bevorzugt von den Caco-2-Zellen benutzt wird, um die Nanopartikel aufzunehmen, lässt sich nicht abschließend festlegen. Bei allen geblockten Wegen ist eine Aufnahme in einige wenige Zellen feststellbar. Blockt man alle drei Mechanismen gleichzeitig, findet man immer noch einen geringen Anteil an fluoreszenten Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um geschädigte oder tote Zellen handelt, die die Partikel passiv aufnehmen. Zusätzlich ist nicht ganz der Clathrin- und Caveolin-unabhängige Aufnahmemechanismus für die Internalisierung von Nanopartikeln auszuschließen, welcher nicht blockiert wurde mit den drei benutzten Inhibitoren.

### **5.1.2 SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel**

#### **Intrazellulärer pH-Wert**

Der pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen nach der Inkubation mit SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln wurde analysiert. Der pH-Wert der Zellen ändert sich nach dem Einwirken von SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln nicht signifikant (Tabelle 12).

#### **Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration**

Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von Erythrozyten und Caco-2-Zellen zeigt bei keinem der beiden Zelltypen einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollmessungen (Tabelle 13).

#### **Zytotoxizität**

Die Messung der Annexin-positiven Erythrozyten zeigt keinen merkbaren Anstieg in der PS-Exposition. Die Werte bewegen sich alle um den der Kontrolle.



Wie bei den  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln konnte hier keine Hämolyse der Erythrozyten nach Einwirkung von  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln gefunden werden. Zusammen mit den Experimenten zur PS-Exposition konnte somit keine zytotoxische Wirkung auf Erythrozyten nachgewiesen werden.

Die aus den Zytotoxizitäts-Assays erhaltenen Werte zeigen keine Änderung für Caco-2-Zellen. Somit ergibt sich keine signifikante toxische Aktivität der  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikel (Tabelle .

### **Aufnahme von Nanopartikeln**

Bei Erythrozyten lässt sich in keinem der drei Fälle eine Anlagerung oder Aufnahme der  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikel feststellen (Abbildung 37). Vereinzelt Fluoreszenzsignale im Medium zeigen, dass die Fluoreszenz der Partikel messbar ist, diese sich aber außerhalb von Zellen befinden und dort eventuell zu kleinen Clustern aggregieren.

Im Gegensatz dazu lagern sich die Nanopartikel Si25 und Si45 an den Caco-2-Zellen an (Abbildung 38 links, mitte), hier ist deutlich im Bereich der Plasmamembran eine stark erhöhte Fluoreszenz der Nanopartikel detektierbar. Bei Si80 ist keine Anlagerung oder Aufnahme zu beobachten (Abbildung 38 rechts).

Während die Mechanismen der Aufnahme von Nanopartikeln in Caco-2-Zellen bekannt sind, ist die Anlagerung von Nanopartikeln an die Zellen nicht vollständig geklärt. Hier ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Die beobachtete Anlagerung von Nanopartikeln an Caco-2-Zellen kann zustande kommen durch eine Interaktion der Nanopartikel oder ihrer Grafting-Substanzen mit Rezeptoren der Zelloberfläche (siehe hierzu auch 3.6). Eine weitere Möglichkeit ist die Anreicherung an der Oberfläche durch elektrostatische Wechselwirkungen. Wie es bereits für verschiedene Ionen (zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$ ) und Substanzen bekannt

ist, können positiv geladene Substanzen mit den negativ geladenen Phospholipiden (zum Beispiel PS) mehr oder weniger starke nichtkovalente Bindungen eingehen (Hendrickson und Fullington, 1965). Um abschließende Resultate zu erhalten, müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

### **5.1.3 Au-Nanopartikel**

#### **Intrazellulärer pH-Wert**

Der pH-Wert der Caco-2-Zellen bleibt unverändert zwischen 6,93 und 7,04, der pH der Erythrozyten schwankt zwischen 6,81 und 7,20. Für die Au-Nanopartikel von 18, 25 und 30 nm Größe sinkt der pH-Wert signifikant um bis zu 0,4 Einheiten (Tabelle 14). Da Metall-Nanopartikel und damit auch die Au-Nanopartikel aufgrund ihres größeren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen eine erhöhte katalytische Wirkung zeigen, ist nicht ausgeschlossen, dass dies der Grund für eine Reaktion mit den verschiedenen Substanzen ist.

Beachtet werden muss zusätzlich, dass die Au-Nanopartikel mit Citrat in der Lösung stabilisiert sind. Auch hierdurch könnte der pH leicht reduziert sein, so dass es sich bei den erhaltenen pH-Erniedrigungen um ein Artefakt handeln könnte (auch wenn nur etwa 10-50 µl der Nanopartikelsuspension zu 1 ml der gepufferten physiologischen Lösung zugegeben werden). Die rötliche Färbung von Au-Nanopartikeln könnte ebenso zu einem Quenching führen.

#### **Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration**

Weder bei Erythrozyten noch bei Caco-2-Zellen konnten Unterschiede zu den Kontrollmessungen festgestellt werden (Tabelle 15). Die Fluoreszenzintensität der Zellen variiert von 13,50 bis 15,06 für Erythrozyten (Kontrolle bei 14,43) und von 199,47 bis 245,96 für Caco-2-Zellen (Kontrolle bei 224,18).

### **Zytotoxizität**

Die PS-Exposition von Erythrozyten ist nach der Inkubation mit Au-Nanopartikeln nur bei weniger als 2 % der Zellen ausgeprägt und zeigt somit keinen Effekt (Abbildung 41).

Wie die PS-Exposition zeigte auch die Untersuchung der Hämolyserate keine toxische Wirkung von Au-Nanopartikeln. Es konnte keine signifikante Hämolyse in den durchgeführten Versuchen beobachtet werden.

Es konnte bei keinem der beiden Experimente ein Einfluss der Au-Nanopartikel auf die Caco-2-Zellen ermittelt werden. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen (Abbildung 42).

### **Liposomen mit Nanopartikeln**

Diese Nanopartikel haben neben der besseren Detektierbarkeit durch die Fluoreszenz den Vorteil, dass sie, verpackt in Liposomen über Transfektion besser in Zellen geschleust werden können. Diese Nanopartikel-gefüllten Liposomen können als eine Vorstufe zum Drug Targeting angesehen werden. Spezifische Fremdmoleküle (zum Beispiel Antikörper) können an sie angeheftet werden, durch welche die Selektivität im Bezug auf den Wirkort erhöht werden kann. Hier wurde nach der Inkubation eine Fluoreszenz in Caco-2-Zellen beobachtet. In Erythrozyten konnten keine Nanopartikel nachgewiesen werden. Da diese keine aktiven Aufnahmemechanismen für Nanopartikel besitzen, tritt trotz der Liposomen keine passive Durchdringung der Erythrozytenmembran auf. Die eingesetzten DPPC-Liposomen dienen also gezielt zur Verbesserung der aktiven Aufnahme in endozytotisch aktive Zellen (wie Caco-2-Zellen).

## **Zusammenfassung der Ergebnisse mit unterschiedlichen Nanopartikeln**

Die Versuche zeigen deutlich, dass die Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel, welche im Rahmen des Projektes NanoMagDye synthetisiert wurden und in der biomedizinischen Applikation eingesetzt werden sollen, keinen Einfluss auf die Toxizität von Erythrozyten und Caco-2-Zellen haben. Es sind zum Teil geringe Effekte bei pH-Wert und Ca<sup>2+</sup>-Konzentration vorhanden, diese bewegen sich aber in einem physiologisch nicht relevanten Rahmen. Die fertigen, gegräfteten Nanopartikel (Fe10-D2-B) zeigen auch hier keine Veränderungen. Deshalb sollten die Nanopartikel Fe10-D2-B medizinisch an Menschen einsetzbar sein.

### **5.2 PU-Nanofasern**

#### **Formveränderungen von Erythrozyten**

Bei der Untersuchung von Erythrozyten im Sauerstoffplasma-behandelten Faserverbund sieht man besonders im Fluoreszenzbild zwar keine drastische Veränderung der Form einzelner Erythrozyten, jedoch sind vereinzelte lokale Deformationen in Form von einer oder mehreren punktuellen Ausstülpungen der Membran zu den Fasern hin sichtbar (gelbe Pfeile).

Unterschiede zwischen den Sauerstoffplasma-behandelten Fasern und den unbehandelten Fasern konnten nicht beobachtet werden. Da die Formveränderungen bei beiden Proben auftauchen, lässt sich daraus schließen, dass die Formveränderungen nicht aufgrund von spezifischer Adhäsionen verursacht werden, sondern durch lokale Anhaftungen der Zellen an die PU-Fasern entstehen. Eine Bestätigung dieser Theorie konnte unterstützt werden durch Messungen der PS-Exposition, welche weder in der gesamten Zelle noch an den formveränderten Membranabschnitten (Ausstülpungen) nicht erhöht vorliegt (Daten nicht dargestellt). Eine Interaktion der Fasern mit dem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt

konnte ebenso ausgeschlossen werden. Abbildung 28 links zeigt keine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

### **Eindringtiefe und -geschwindigkeit von Erythrozyten**

Die Erythrozyten sind in der Lage, etwa 15  $\mu\text{m}$  tief in das Fasernetz einzudringen. Bei größeren Tiefen sind nur noch selten vereinzelt Erythrozyten zu finden. Es konnte kein Unterschied der unbehandelten zu den sauerstoffplasma-behandelten PU-Fasern beobachtet werden.

### **5.3 Nanostrukturierte Oberflächen**

Es konnte bei der Oberfläche O1 keine dominierende Form der Erythrozyten festgestellt werden, sowohl Diskozyten als auch Echinozyten waren zu gleichen Anteilen zu finden. Eine Veränderung zur Kontrolle wurde nicht festgestellt.

Wie die Beispielabbildungen zeigen, erhöht sich der Anteil an Echinozyten mit steigender Eintauchgeschwindigkeit, besonders bei O8 und O9 sind fast ausschließlich Echinozyten zu sehen. Formveränderungen entstehen durch verschiedene Impulse. Nach mechanischem Stress beim Kontakt der Zellen mit einem Hindernis oder einer Oberfläche ändert sich spontan innerhalb einer Sekunde die Form (Paper Münster, DHM). Hierzu sind Membranumlagerungen und Veränderungen im Aktin-Gerüst nötig. Erste Hinweise lassen darauf schließen, dass hierfür ausschlaggebend eine, nur wenige Millisekunden lange, Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sein könnte. Des Weiteren könnte eine Änderung der Konformation des Bande 3-Proteins verantwortlich sein für eine Formveränderung (Betz et al., 2007). Weitere Untersuchungen konnten mit den uns vorliegenden technischen Möglichkeiten nicht durchgeführt werden. Die Struktur der Oberfläche scheint einen weiteren Einfluss auf das Verhalten der Erythrozyten zu haben. Inwieweit die Eintauchgeschwindigkeit der unterschiedlichen Oberflächen einen Einfluss auf die Oberflächenstruktur hat

(welche letztendlich dann für die Formveränderung verantwortlich ist), bleibt offen.

Es konnte mit allen Oberflächen sowohl kurzfristig als auch langfristig nach 30 min keine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle auf einer unbeschichteten Glasoberfläche festgestellt werden. Die oben genannten schnellen Änderungen innerhalb einiger Millisekunden können nicht nachgewiesen werden, da bei den existierenden, niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen eine Belichtungszeit pro Aufnahme von 500 ms gewählt werden musste. Die im Gegensatz dazu gefundene statistisch signifikante Erniedrigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei einigen Oberflächen lässt auf keinen Effekt schließen. Da die freie Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Erythrozyten im nanomolaren Bereich liegt und die Kontrolle bereits nahe dem Detektionsminimum liegt, sind Schwankungen in diesen Bereichen als nicht physiologisch signifikant zu beurteilen.

#### **5.4 Kohlenhydrat-synthetisierte Polypeptide**

Das analysierte Polypeptid PP1 zeigt aufgrund seines fehlenden Zuckers nur eine geringe Bindung an die Oberfläche von Erythrozyten. Bei den drei zuckerhaltigen Polypeptiden PP2 bis PP4 fällt die Menge an gebundenem Polypeptid erheblich höher aus. Das Fluoreszenzsignal von PP3 und PP4 ist deutlich stärker als bei PP1 (34,6 beziehungsweise 51,0 statt 5,9), die höchste Fluoreszenzintensität zeigt PP2 mit 103,4.

Erythrozyten zeigen somit für alle drei verwendeten Zucker eine erhöhte Affinität. Dies zeigt, dass sich die Polypeptide nicht durch unspezifische Wechselwirkungen an die Erythrozyten anlagern, sondern spezifisch durch Rezeptoren erkannt und gebunden werden. Dass die verschiedenen Polypeptide unterschiedlich stark binden, kann zum einen auf eine ungleiche Verteilung von selektiven Kohlenhydrat-Rezeptoren hinweisen als auch eine Selektivität der

Rezeptoren (Park et al., 2007; Gattegno et al., 1991; Lehmann und Scheuring, 1995).

## 5.5 Fluoroalkylierte Phosphate

### Intrazellulärer pH-Wert

Während der pH-Wert der Caco-2-Zellen sich nicht ändert und zwischen 7,14 und 7,26 bleibt, ist der pH-Wert der Erythrozyten zum Teil drastisch verringert. Für die beiden Moleküle *F8H11* und *F8H2* fällt er auf 6,92 beziehungsweise 6,94, für *F4H11* sinkt er sogar bis auf 6,57. Beim doppelkettigen Molekül (*F6H6*)<sub>2</sub> GPC liegt der Wert bei 7,18, und damit nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle (7,20) (Tabelle 17). Im Vergleich zeigt das nicht-fluorinierte Molekül (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OP(O)(OH)<sub>2</sub> bei gleicher Konzentration ebenfalls keine Änderung des pH-Wertes.

### Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Bei den Erythrozyten ergibt sich eine signifikante Änderung der Fluoreszenz und damit der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von der Kontrolle, wenn die Zellen mit den einzelkettigen Molekülen inkubiert werden. Die Werte steigen an von 14,43 auf 129,77 bei *F4H11*. Das zweikettige Molekül (*F6H6*)<sub>2</sub> GPC ändert nichts am Ca<sup>2+</sup>-Gehalt. Für die Caco-2-Zellen wurde keine Änderung der Fluoreszenzintensitäten gefunden (Tabelle 18).

### Zytotoxizität

Alle untersuchten Zellproben zeigten nach der Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten einen hohen Anteil an FITC annexin V-positiven Zellen. Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, liegt der Anteil der Zellen mit PS-Exposition für das Molekül *F8H11* bei 29±17 %, für *F4H11* und *F8H2* bei nahezu 100 % (99±1

% beziehungsweise  $97\pm 3$  %). Hier lässt sich erneut ein Rückschluss darauf ziehen, dass die Exposition von PS von der Länge der Kette abhängig ist. Die Inkubation der Erythrozyten mit  $(F6H6)_2$  GPC führt bei  $38\pm 10$  % der Zellen zur PS-Exposition. Auch hier ist mit dem Kontrollmolekül keine PS-Exposition zu sehen.

Auch die Bestimmung der Hämolyserate zeigte deutliche Ergebnisse. So hämolysieren bei  $F8H11$  20 % der Zellen, bei  $F4H11$  und  $F8H2$  jeweils 95 % der Zellen und bei  $(F6H6)_2$  GPC 10 %. Die erhaltenen Werte für die PS-Exposition zeigen also nur noch die letzten überlebenden Zellen. Es ist also nicht verwunderlich, dass bei einer Hämolyse von 95 % die überlebenden 5 % bereits starke Anzeichen einer Eryptose zeigen und PS auf die Außenseite der Membran translokiert haben. Die Effekte für das doppelkettige Molekül  $(F6H6)_2$  GPC zeigen nur eine geringe Hämolyse. Somit konnte nachgewiesen werden, dass doppelkettige fluoroalkylierte Phosphate weniger toxisch als ihre einzelkettigen Vertreter reagieren. Das nicht-fluorinierte Kontrollmolekül zeigte ebenfalls keine Auswirkung auf eine Hämolyse von Erythrozyten.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse mit fluoroalkylierten Phosphaten**

Sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin ist die Sonographie (Echographie, umgangssprachlich Ultraschall) ein verbreitetes Diagnoseverfahren. Mittels einer Sonde werden piezoelektrisch erzeugte Ultraschallwellen (1 – 40 MHz,  $100 \text{ mW/cm}^2$ ) ausgesendet, welche in den Gewebeschichten unterschiedlich stark reflektiert und gestreut und anschließend wieder durch die Sonde detektiert werden. Die Anwendung von Ultraschall (im Gegensatz zur ebenfalls oft verwendeten, aber schädlichen Röntgendiagnostik) erlaubt die Durchführung verschiedener nicht-invasiver und schmerzloser medizinischer Untersuchungen, wie etwa in der pränatalen Vorsorge, zur Untersuchung der Schilddrüse, des Herzens (Echokardiographie, Ultraschallkardiographie), der Nieren und der Harnwege oder der Beurteilung der



Durchblutung von Gefäßen. Eine weitere, wichtige Einsatzmöglichkeit ist die Erkennung von Krebsherden.

Eine Verbesserung der visuellen Diagnose kann durch den Einsatz von Kontrastmitteln erreicht werden. Hierzu werden unter anderem Mikrobläschen (microbubbles) eingesetzt, welche abhängig von der angelegten Ultraschallfrequenz oszillieren und den Schall entsprechend reflektieren (linear oder nichtlinear), wodurch der Einsatzort besser erkennbar ist (Blomley et al., 2001). Im Projekt NanoMagDye wurden neben Nanopartikeln zur Brustkrebsdiagnose auch Mikrobläschen entwickelt, welche eine Detektion des Krankheitsherds mittels Sonographie ermöglichen sollen.

Ein Problem des Einsatzes von Mikrobläschen (für Sonographie und andere biomedizinische Anwendungen (Krafft, 2001) ist die Stabilisierung der Bläschen und die genaue Kontrolle der Größe. Viele dieser Probleme können zum Teil durch den Einsatz von Fluorcarbon-Hydrocarbon-Tensiden neben den Standardtensiden gelöst werden. Diese Fluorcarbon-Hydrocarbone (enthalten zum Teil perfluorierte Kohlenstoffketten) sind bekannt für ihre effektivere und effizientere Wirkung als ihre reinen Hydrocarbon-Derivate. So reduzieren sie Oberflächenspannungen besser und man benötigt weniger Substanzen, um die maximale Effektivität zu erreichen. Verschiedenste Fluorcarbon-Tenside wurden bereits für biomedizinische Anwendungen synthetisiert( Krafft und Riess, 1998; Kissa, 2001; Riess, 2009). Es ist bereits bekannt, dass diese Fluorcarbon-Tenside in der Regel weniger hämolytisch als ihre Hydrocarbon-Derivate wirken und die hämolytische Wirkung und Toxizität abhängig von der steigenden Länge der perfluorinierten Kette relativ zum Hydrocarbon-Abschnitt abnehmen, aber stark abhängig sind von der Art und Ladung der polaren Kopf-Gruppe (Riess et al., 1991; Riess und Krafft, 1998).

Ziel der durchgeführten Versuche war die Untersuchung des Effekts von Fluorcarbon-Hydrocarbon-Phosphaten auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und den intrazellulären pH-Wert von Erythrozyten und Caco-2-Zellen. Im Vergleich dazu

wurde der Effekt eines doppelkettigen Moleküls betrachtet, welches weniger hämolytisch als die einzelkettigen Moleküle reagieren sollte.

Da die Stabilität der Mikrobläschen im menschlichen Körper nicht genau geklärt ist und ein Oszillieren der Bläschen durch Ultraschalleinwirkung diese zum Platzen bringen kann, ist es wichtig, diese einzelnen Komponenten von Mikrobläschen auch separat auf ihre Zytotoxizität zu überprüfen.

Bei den einkettigen Fluoroalkylierten Phosphaten ist deutlich ihr Einfluss auf biologische Systeme zu erkennen. Neben der direkten Interaktion mit der Zellmembran können sie als Tenside Membranproteine, die für den pH-Wert und Ionenhaushalt wichtig sind, denaturieren. Die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Erythrozyten ist ebenso ausgebildet wie die Änderungen im intrazellulären pH-Wert. Das Molekül *F4H11* scheint auch bei der Hämolyserate einen verstärkten Einfluss auszuüben. Hier ist, im Vergleich zu den beiden anderen fluoroalkylierten Phosphaten, der Hydrocarbon-Anteil höher. Dies geht einher mit der gängigen Literatur, dass eine Fluorinierung des Carbon-Rückgrates die Toxizität reduziert [Lit siehe M&M]. Das Molekül *F8H2* hat zwar den höchsten Fluorocarbon-Anteil, der Effekt scheint sich aber darauf zurückzuführen lassen, dass die Länge des Moleküls insgesamt geringer ist als bei den übrigen Molekülen. Durch die geringe Größe sind Interaktionen mit anderen Molekülen, Ionen und Proteinen und das Eindringen in Zellen erleichtert. Ein Vergleichsexperiment mit dem nicht-fluorinierten Molekül  $(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2)$  ergab im Gegensatz dazu keine Effekte. Weitere Versuche haben gezeigt, dass das Molekül jedoch bei höheren Konzentrationen ( $> 50 \mu\text{g/ml}$ ) zu einer vollständigen Hämolyse der Erythrozyten führt.

## 5.6 Messung des Membranpotenzials von Zellen

Aus der Messung der DiBAC<sub>4</sub>(3)-Fluoreszenzen sieht man bei der Kontrolle eine konstante Fluoreszenz von 200 - 215. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenz beim Wechsel der Zellen in eine Lösung mit niedriger Ionenstärke (LIS200 beziehungsweise LIS250) erhöht und fällt im Laufe von 30 Minuten wieder auf den Ausgangswert ab. Anzumerken ist, dass vom Transferieren der Zellen in das neue Medium bis zum eigentlichen Messen eine Zeit von ca. 10-15 Sekunden verloren geht. In dieser Zeit steigt das Membranpotenzial rasch an und ist zum Zeitpunkt der ersten Messung bereits wieder am abfallen.

Durch die Änderung der Lösung kommt es, wie erstmal 1904 von Gürber beschrieben zu einem Verlust von Cl<sup>-</sup> in den Erythrozyten. Da sich das Membranpotenzial anhand des Nernst-Potenzials für Cl<sup>-</sup>-Ionen ausbildet, ändert sich das Membranpotenzial, da NaCl außen in den beiden LIS-Lösungen durch Saccharose ersetzt wird.

Mit den beiden Lösungen LIS200 und LIS250 wurde ein Vergleich durchgeführt. LIS250 ist eine isotonische Lösung, jedoch führt die niedrigere Ionenkonzentration im Vergleich zur physiologischen Lösung zu einer Verringerung des Zellvolumens. Um auszuschließen, dass die Volumenänderung einen Einfluss auf das Membranpotenzial hat, wurden dieselben Versuche mit LIS200 statt mit LIS250 durchgeführt. Hier sind statt 250 mM Saccharose nur 200 mM Saccharose enthalten. LIS200 ist somit nicht isotonisch und führt zu einem Anschwellen der Zellen. Das Anschwellen gleicht sich mit dem Schrumpfen durch die niedrigere Osmolarität aus, so dass das Volumen der Erythrozyten im Vergleich zur physiologischen Lösung unverändert bleibt.

Eine Kalibrierung wurde mit Valinomycin durchgeführt. Die erhaltene Gerade (Abbildung 62) zeigt einen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigendem Membranpotential. Da das Membranpotenzial in den positiven Bereich erhöht wird und die Kalibrierung mit Valinomycin einen Wert von etwa 10 mV nicht

übersteigen kann, wurde zusätzlich eine Kalibrierung mit SQI-Pr im positiven Bereich durchgeführt. Mit den erhaltenen Ergebnissen für SQI-Pr konnte das Membranpotenzial für den Farbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) nicht kalibriert werden, da die Werte gegensätzlich zu den ermittelten Werten für Valinomycin (welche den Literaturwerten entsprechen (Hoffman und Larris, 1974)) sind. Eine Erklärung könnte die Aktivität des NSVDC-Kanals bieten, welcher bei positiven Membranpotenzialen aktiviert wird und neben dem durch SQI-Pr vermittelten Na<sup>+</sup>-Ausgleich einen Ausgleich an K<sup>+</sup>-Ionen fördert und das Membranpotenzial damit wieder reduziert. Ein steigendes Membranpotenzial der SQI-Pr-inkubierten Erythrozyten fördert eine steigende Aktivität des NSVDC-Kanals und damit einen erneuten, stärkeren Abfall des Membranpotenzials. Um die Aktivität des NSVDC-Kanals zu unterbinden, müsste eine Inhibition mit 1 mM *N*-Ethylmaleimid (NEM) (Bennekou) durchgeführt werden. Diese zeigte jedoch nicht das erwartete Ergebnis von steigenden Fluoreszenzintensitäten (Ergebnisse nicht dargestellt), weshalb auf die Aktivität weiterer, mit NEM nicht inhibierter Transportproteine geschlossen werden kann. Eine Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse wird zurzeit in der Arbeitsgruppe Mer et Santé, Centre National de la Recherche Scientifique / Université Pierre et Marie Curie (CNRS-UPMC), Station Biologique, Roscoff, Frankreich von Dr. S. Egée mittels CCCP-Methode (Bennekou und Christophersen, 1986) durchgeführt. CCCP (Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon) ist ein Protonophor, durch welches es möglich ist, das Membranpotential aus dem pH-Wert zu berechnen. Erste Messungen mit LIS250 bestätigen die erhaltenen Erkenntnisse (Abbildung 64).

Somit können die in Abbildung 61 dargestellten Werte für die Fluoreszenzintensität nur als relativ angesehen werden und nicht mit absoluten Membranpotenzialen verglichen werden. Sie zeigen jedoch, dass bei einer Veränderung der Ionenstärke das Potenzial ansteigt und im Anschluss durch die Aktivität verschiedener Kanäle und Pumpen wieder auf ihren Normwert reduziert wird. LIS200 und LIS250 zeigten keine unterschiedlichen Effekte. Hieraus lässt sich schließen, dass die Membranpotenzialänderung nicht volumenabhängig ist.

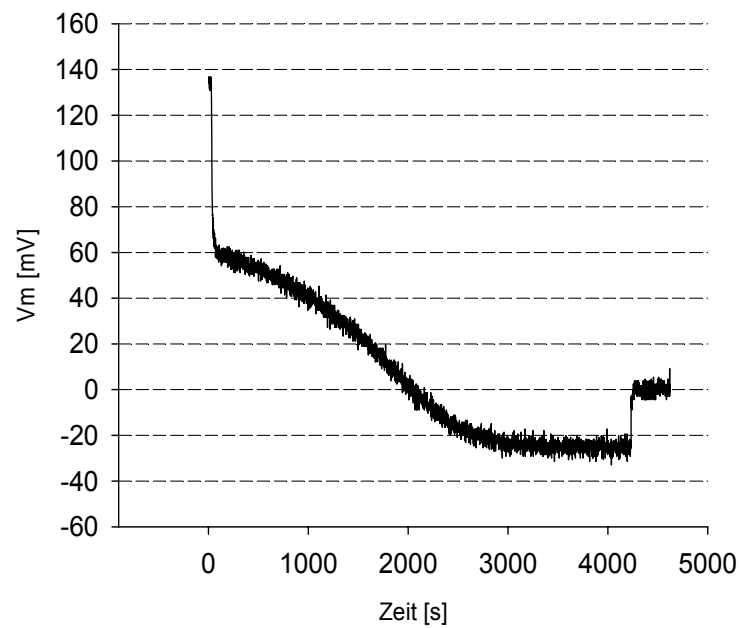


Abbildung 64: Messung des Membranpotentials von Erythrozyten nach dem Übertragen der Zellen in LIS250, durchgeführt von Dr. S. Egée in der Arbeitsgruppe Mer et Santé, CNRS-UPMC, Station Biologique, Roscoff, Frankreich.

## 6. Zusammenfassung/Summary

### Zusammenfassung

Nanomaterialien haben das Potential, in vielfältigen biomedizinischen Applikationen eingesetzt zu werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch deutlich auf, dass verschiedene Nanopartikel und Materialien neben ihrem gewünschten Effekt auch unspezifische Effekte an Erythrozyten und anderen Zelltypen auslösen können. Bei der Analyse der verschiedenen Nanopartikel wurden bei SiO<sub>2</sub>- und Au-Nanopartikeln keine Effekte gefunden, jedoch beeinflussen nackte Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel den pH-Wert von Erythrozyten. Die Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel, welche im Rahmen des EU-Projektes NanoMagDye hergestellt wurden und in der medizinischen Applikation eingesetzt werden sollen, zeigten keine Toxizität und Beeinflussung der untersuchten Zelltypen. Somit sollten diese Nanopartikel in der humanen Anwendung unbedenklich sein, da sie keine toxischen Nebeneffekte auslösen.

Im Gegensatz dazu wurde bei fluoroalkylierten Phosphaten, welche zur Synthese von Mikrobläschen verwendet werden, ein deutlicher Anstieg der Hämolyse gefunden. Da die Mikrobläschen selbst aus Stabilitätsgründen nicht untersucht werden konnten, muss gewährleistet werden, dass diese bis zur fertigen Anwendung eine ausreichende Beständigkeit besitzen.

Nanopartikel sind innovative Werkzeuge zur biomedizinischen Verwendung, jedoch muss bei potentiellen Anwendungen eine genauere Betrachtung von Nebeneffekten und toxischen Auswirkungen durchgeführt werden.

### Summary

Nanomaterials have a high potential of usage in many different biomedical applications. The presented results show clearly that different nanoparticles and materials show unspecific effects on erythrocytes and other cell types. The

analysis of different nanoparticles presents no effects for  $\text{SiO}_2$  and Au nanoparticles. In contrast naked  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles affect the intracellular pH for erythrocytes. The nanoparticles produced in the EC project NanoMagDye which are planned to be used in the medical application show now toxicity and influence on the investigated cell types. Therefore these nanoparticles should be harmless in the human application.

On the other side we found a significant increase in the rate of haemolysis after the incubation with fluoroalkylated phosphates (used for synthesis of microbubbles). For stability reasons, we could not analyse the microbubbles themselves. Therefore it must be ensured that the microbubbles have a adequate stability before used in the application.

Nanoparticles are innovative tools for biomedical applications, but we have to ensure for potential applications, which toxic side effects can occur.

## 7. Literatur

Ach J, Siep L (Eds.), 2006

*Nano-bio-ethics: ethical dimensions of nanobiotechnology*

Lit Verlag, Berlin, Deutschland

Allen JA, 2007

*Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling*

Nature, 8 128-140

Apopa PL, Qian Y, Shao R, Lan Guo N, Schwegler-Berry D, Pacurari M, Porter D, Xianglin S, Vallyathan V, Castranova V, Flynn DC, 2009

*Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling*

Part Fibre Toxicol, 6 (1)

Basly B, Felder-Flesch D, Perriat P, Billotev C, Taleb J, Pourroy G, Begin-Colin S, 2010

*Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI*

Chem Comm, 46 985-987

Bennekou P, Christophersen P, 1986

*Flux ratio of valinomycin-mediated  $K^+$  fluxes across the human red cell membrane in the presence of the protonophore CCCP*

J Membr Biol, 93 (3) 221-227

Bennekou P, Christopersen P, 2003

*Ion channels*

in: Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), *Red cell membrane transport in health and disease*, Springer, Berlin, Deutschland, 139-152



Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), 2003

*Red cell membrane transport in health and disease*, Springer, Berlin, Deutschland

Bernhardt I, Weiss E, 2003

*Passive membrane permeability for ions and membrane potential*

in: Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), *Red cell membrane transport in health and disease*, Springer, Berlin, Deutschland, 83-109

Bernhardt I, Kummerow D, Weiss E, 2001

*K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchange in human erythrocytes activated under low ionic strength conditions*

Blood Cells Mol Dis, 27(1) 108-111

Betz T, Bakowsky U, Müller MR, Lehr CM, Bernhardt I, 2007

*Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells*

Bioelectrochemistry, 70 (1) 122-126

Blomley MJ, Cooke JC, Unger EC, Monaghan MJ, Cosgrove DO, 2001

*Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound*

BMJ, 322 (7296) 1222-1225

Bock U, Kolac C, Borchard G, Koch K, Fuchs R, Streichhan P, Lehr CM, 1998

*Transport of proteolytic enzymes across Caco-2 cell monolayers*

Pharm Res, 15 (9) 1393-1400

Boucher PM, 2008

*Nanotechnology: legal aspects*

CRC Press, Boca Raton, USA

Bretscher MS, 1972

*Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes*

Nat New Biol, 236 (61) 11-12

Bretscher MS, 1973

*Membrane structure: some general principles*

Science, 181 (4100) 622-629

Cala PM, 1980

*Volume regulation by Amphihuma red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ionflux pathways*

J Gen Physiol, 76 683-708

Cala PM, 1983

*Cell volume regulation by Amphihuma red blood cells. The role of  $Ca^{2+}$  as a modulator of alkali metal/ $H^+$  exchange*

J Gen Physiol, 82 761-784

Carafoli E, 1992

*The  $Ca^{2+}$  pump of the plasma membrane*

J Biol Chem, 267 2115-2118

Carafoli E, 1997

*Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships*

Basic Res Cardiol, 92 suppl 1:59-61

Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S, 2008

*Overcoming the challenges of membrane protein crystallography*

Curr Opin Struct Biol, 18 (5) 581-586

Conner SD, Schmid SL, 2003

*Regulated portals of entry into the cell*

Nature, 422 (6927) 37-44

Cullis PR, de Kruijff B, 1979

*Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes*

Biochim Biophys Acta, 559 (4) 399-420

Daou TJ, Pourroy G, Begin-Colin S, Greneche JM, Ulhaq-Bouillet C, Legare P, Bernhardt P, Leuvrey C, Rogez G, 2006

*Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles*

Chem Mater, 18 4399-4404

Daou TJ, Pourroy G, Greneche JM, Bertin A, Felder-Flesch D, Begin-Colin S, 2009

*Water soluble dendronized iron oxide nanoparticles*

Dalton Transactions, 23 4442-4449

Deuticke B, 2003

*Membrane lipids and proteins as a basis of red cell shape and its alterations*

in: Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*, Springer, Berlin, Deutschland, 27-60

Ellory JC, Young JD (Eds.), 1982

*Red cell membranes: a methodological approach*

Academic Press, London, Großbritannien

Fievet B, Guizouarn H, Pellissier B, Garcia-Romeu F, Motais R, 1993

*Evidence for a  $K^+$ - $H^+$  exchange in trout red blood cells*

J Physiol, 462 597-607

Fogh J, Trempe G, 1975

*Chapter 13*

in: Fogh J (Ed.), *Human tumor cells In vitro*, Plenum, New York, USA, 115-141

García-Sancho J, Lew VL, 1988a

*Heterogenous calcium and adenosine triphosphate distribution in calcium-permeabilized human red cells*

J Physiol, 407 523-539

García-Sancho J, Lew VL, 1988b

*Properties of the residual calcium pools in human red cells exposed to transient calcium loads*

J Physiol, 407 541-556

Gárdos G, 1958

*The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes*

Biochim Biophys Acta, 30 653-654

Gattegno L, Bladier D, Vaysse J, Saffar L, 1991

*Inhibition by carbohydrates and monoclonal anticomplement receptor type 1, on interactions between senescent human red blood cells and monocytic macrophagic cells*

Adv Exp Med Biol, 307 329-337

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P, 2005

*Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells*

Environ Health Perspect, 113 1555-1560

Gürber A, 1904

*Salze des Blutes, II. Teil, Salze der Blutkörper*

Habilitationsschrift, Kgl. Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland

Haest CWM, 2003

*Distribution and movement of membrane lipids*

in: Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*, Springer, Berlin, Deutschland, 489-509

Harris EH, Mainzel M, 1952

*Distribution of ions in suspensions of human erythrocytes*

J Physiol, 118 40-53

Hartlen KD, Athanasopoulos AP, 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 (5) 1714-1720

Haugland RP (Ed.), 2002

*Molecular Probes, Handbook of fluorescent probes and research products*

Eugene, USA

Hendrickson HS, Fullington JG, 1965

*Stabilities of metal complexes of phospholipids: Ca(II), Mg(II), and Ni(II) complexes of phosphatidylserine and triphosphoinositide*

Biochemistry, 4 (8) 1599-1605

Hillaireau H, Couvreur P, 2009

*Nanocarriers entry into cell: relevance to drug delivery*

Cell Mol Life Sci, 66 (17) 2873-2896

Hillyer JF, Albrecht RM, 2001

*Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles*

J Pharm Sci, 90 1927-1936

Hoffman JF, Larris PC, 1974

*Determination of membrane potentials in human and Amphihuma red blood cells by means of the fluorescent probe*

J Physiol, 239 519-552

Israelachvili JN, 2011

*Intermolecular and Surface Forces*

Elsevier, Amsterdam, Niederlande

Kaestner L, Christophersen P, Bernhardt I, Bennekou P, 2000

*The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation*

Bioelectrochem, 52 (2) 117-125

Kaestner L, Bernhardt I, 2002

*Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance*

Bioelectrochem, 55 71-74

Kaestner L, Tabellion W, Weiss E, Bernhardt I, Lipp P, 2005

*Calcium imaging of individual erythrocytes: problems and approaches*

Cell Calcium, 39 13-19

Kissa E, 2001

*Fluorinated surfactans and repellents*

Marcel Dekker, New York, USA

Knauf PA, Pal P, 2003

*Band 3 mediated transport*

in: Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), *Red cell membrane transport in health and disease*, Springer, Berlin, Deutschland, 251-301

Krafft MP, 2001

*Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research*

Adv Drug Deliv Rev, 47 209-228

Krafft MP, Riess JG, 1998

*Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution*

Biochimie, 80 489-514

Kummerow D, 1999

*Der experimentelle Nachweis eines  $K^+(Na^+)/H^+$ -Austausches an der Membran von Humanerythrozyten*

Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Deutschland

Kummerow D, Hamann J, Browning JA, Wilkins R, Ellory JC, Bernhardt I, 2000

*Variations of intracellular pH in human erythrocytes via  $K^+(Na^+)/H^+$  exchange under low ionic strength conditions*

J Membrane Biol, 176 207-216

Lang KS, Lang PA, Bauer C, Durantou C, Wieder T, Huber SM, Lang F, 2005

*Mechanisms of suicidal erythrocyte death*

Cell Physiol Biochem, 15 (5) 195-202

Lang J, 2012

*Untersuchungen zur Existenz von NHE-Isoformen in Plasmamembranen humaner Erythrozyten*

Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

Lehmann J, Scheuring M, 1995

*Mono-, di- and tri-antennary D-galactose ligands as competitive inhibitors and photoaffinity labels of the hexose transporting system in erythrocytes. A model for the irreversible blocking of receptors in cell membranes*

Carbohydr Res, 276 (1) 57-74

Lew VL, Daw N, Perdomo D, Etzion Z, Bookchin RM, Tiffert T, 2003

*Distribution of plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump activity in normal red blood cells*

Blood, 102 4206-4213

Lew VJ, García-Sancho J, 1989

*Measurement and control of intracellular calcium in intact red cells*

in: Fleischer S, Fleischer B (Eds.), *Methods in enzymology*, 173, *Biomembranes, part T: Cellular and subcellular transport: Eukaryotic (nonepithelial) cells*,

Academic Press, San Diego, USA, 100-112

Maldonado HM, 1992

*$Na^+/H^+$  and  $K^+/H^+$  exchangers in *Amphihuma* erythrocyte*

Dissertation, University of California, Davis, USA

Moersdorf D, Hugounenq P, Phuoc LT, Mamlouk-Chaouachi H, Felder-Flesch D, Begin-Colin S, Pourroy G, Bernhardt I, 2010

*Influence of magnetic iron oxide nanoparticles on red blood cells and Caco-2 cells*

Adv Biosc Biotechnol, 1 (5) 439-443



Nel A, Xia T, Mädler L, Ning L

*Toxic potential of materials at the nanolevel*

Science, 311 622-627

Neumeyer A, 2010

*The potential of silica nanoparticles as oral drug carriers*

Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

Nikinmaa M, 2003

*Gas transport*

in: Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*, Springer, Berlin, Deutschland, 489-509

Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J, 2003

*Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*

J Phys D: Appl Phys, 36 R167-R181

Park KH, Na K, Lee YS, Chang WK, Park JK, Akaike T, Kim DK, 2007

*Effects of mannosylated glycopolymers on specific interaction to bone marrow hematopoietic and progenitor cells derived from murine species*

J Biomed Mater Res A, 82 (2) 281-287

Park K, Lee S, Kang E, Kim K, Choi K, Kwon IC, 2009

*New generation of multifunctional nanoparticles for cancer imaging and therapy*

Adv Funct Mater, 19 1553-1566

Rabinovitch M, 1995

*Professional and non-professional phagocytes: an introduction*

Trends Cell Biol, 5 (3) 85-87

Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans E, 2000  
*Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers*  
Biophys J, 79 (1) 328-339

Reum N, Fink-Straube C, Klein T, Hartmann RW, Lehr CM, Schneider M, 2010  
*Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates*  
Langmuir, 26 (22) 16901-16908

Riess JG, Pace S, Zarif L, 1991  
*Highly effective surfactants with low hemolytic activity*  
Adv Mater, 3 249-251

Riess JG, Krafft MP, 1998  
*Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery*  
Biomaterials, 19 1529-1539

Riess JG, 2009  
*Highly fluorinated amphiphilic molecules and self-assemblies with biomedical potential*  
Curr Opin Colloid Interf Sci, 14 294-304

Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P, 2006  
*Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques*  
Environ Sci Technol, 40 4353-4359

Satterfield T, Kandlikar M, Beaudrie CEH, Conti J, Herr Harthorn B, 2009  
*Anticipating the perceiving risk of nanotechnologies*  
Nature Nanotechnol, 4 752-758

Simons K, van Meer G, 1988

*Lipid sorting in epithelial cells*

Biochemistry, 27 (17) 6197-6202

Sims PJ, Wiedmer T, 2001

*Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling*

Thromb Haemost, 86 266-275

Singer SJ, Nicolson GL, 1974

*The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*

Science, 175 720-731

Steimer A, Haltner E, Lehr CM, 2005

*Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery*

J Aerosol Med, 18 (2) 137-182

Taniguchi N, 1974

*On the basic concept of nanotechnology*

in: *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng., Part II*, Japan Society of Precision Engineering,

Tokyo, Japan

Tiffert T, Etzion Z, Bookchin RM, Lew VL, 1993

*Effects of deoxygenation on active and passive Ca<sup>2+</sup> transport and cytoplasmic*

*Ca<sup>2+</sup> buffering in normal human red cells*

J Physiol, 464 529-544

Tiffert T, Bookchin RM, Lew VL, 2003

*Calcium homeostasis in normal and abnormal human red cells*

in: Bernhardt I, Ellory JC (Eds.), *Red cell membrane transport in health and disease*, Springer, Berlin, Deutschland, 373-405

Tsien RY, 1981

*A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells*

Nature, 290 527-528

van Dijck PWM, van Zoelen EJJ, Seldenrijk R, van Deenen LLM, de Gier J, 1976

*Calorimetric behaviour of individual phospholipid classes from human and bovine erythrocyte membranes*

Chem Phys Lipids, 17 (2-3) 336-343

Verhoeven B, Schlegel RA, Williamson P, 1995

*Mechanisms of phosphatidylserin exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes*

J Exp Med, 182 (5) 1597-1601

Wang KKW, Villalobo A, Roufogalis BD, 1992

*The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter*

Trends in Cell Biol, 2 46-52

Wieth JO, Brahm J, Funder J, 1980

*Transport and interactions of anions and protons in the red blood cell membrane*

Ann NY Acad Sci, 341 394-418

Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC, 2008

*Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments*

Clin Pharmacol Ther, 83 (5) 761-769

---

## 8. Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über verschiedene Membranlipide	9
2	Verteilung von Lipiden in der Membran von Erythrozyten	10
3	Transportmechanismen des menschlichen Erythrozyten für $K^+$ und $Na^+$	15
4	Übersicht über die verschiedenen Aufnahmemechanismen in biologischen Zellen	24
5	Jablonski-Diagramm	26
6	Zwei- und Drei-Photonen-Fluoreszenzanregung im Vergleich zur klassischen Anregung am Beispiel von fura-2.	27
7	Dendritische Moleküle gegrattet an $Fe_3O_4$ -Nanopartikel	35
8	Struktur der Dendrimere (a) D1-B und (b) D2-B	35
9	Struktur der glycosylierten Polypeptide, am Beispiel von PP3, in welchem Mannose gebunden wurde	40
10	Strukturformel des doppelkettigen Moleküls $(F_6H_6)_2$ GPC. $R = CF_3(CF_2)_5(CH_2)_5$	41
11	Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	44
12	Absorptions- und Emissionsspektrum von Fluorescein	45
13	Absorptions- und Emissionsspektrum von BCECF bei pH 5,5 und pH 9,0	47
14	Absorptions- und Emissionsspektrum von fluo-4	48
15	Absorptionsspektrum (gemessen bei 510 nm) und Emissionsspektrum (Anregung bei 340 nm) von fura-2 (A) in $Ca^{2+}$ -haltigem Medium und (B) in $Ca^{2+}$ -freiem Medium	49
16	pH-Werte von Erythrozyten, inkubiert mit $Fe_3O_4$ -Nanopartikeln	61
17	pH-Werte von Caco-2-Zellen, inkubiert mit $Fe_3O_4$ -Nanopartikeln	62
18	pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit Dendrimer- und Farbstoff-gegratteten $Fe_3O_4$ -Nanopartikeln	62
19	Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Erythrozyten, inkubiert mit $Fe_3O_4$ -Nanopartikeln	64

---

20	Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Caco-2-Zellen, inkubiert mit Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikeln	65
21	Durchflusszytometer-Analyse von Caco-2-Zellen, inkubiert mit Fe <sub>20</sub> beziehungsweise Fe <sub>20</sub> -D1	66
22	Durchflusszytometer-Analyse von Fe <sub>20</sub> -D1 mit fluo-4 AM markierten Caco-2-Zellen	66
23	Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit Dendrimer- und Farbstoff-gegrafteten Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikeln	67
24	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel NP10-D1-B in Suspension	68
25	Prozentuale Anzahl an Erythrozyten, die nach Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel-Inkubation eine PS-Exposition zeigen	69
26	Relative Absorption der Marker in den beiden Zytotoxizitäts-Assays	70
27	Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Erythrozyten und Fe <sub>10</sub> -D1-B (links, Vergrößerung 60x) beziehungsweise Fe <sub>10</sub> -D2-B (rechts, Vergrößerung 60x)	71
28	Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Caco-2-Zellen und Fe <sub>10</sub> -D1-B (links, Vergrößerung 60x) beziehungsweise Fe <sub>10</sub> -D2-B (rechts, Vergrößerung 10x)	72
29	Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe <sub>10</sub> -D2-B (Vergrößerung 100x). Der Clathrin-abhängige Aufnahmemechanismus wurde blockiert	72
30	Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe <sub>10</sub> -D2-B (Vergrößerung 100x). Der Caveolin-abhängige Aufnahmemechanismus wurde blockiert	73
31	Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe <sub>10</sub> -D2-B (Vergrößerung 100x). Die Aufnahme via Phagozytose wurde blockiert	73
32	Übereinander gelegtes Fluoreszenz- und Durchlichtbild von Caco-2-Zellen und Fe <sub>10</sub> -D2-B (Vergrößerung 100x). Die Aufnahme über drei Mechanismen wurde blockiert	74

33	pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln	75
34	Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln	76
35	Anzahl an Erythrozyten (in %), die nach SiO <sub>2</sub> -Nanopartikel-Inkubation eine PS-Exposition zeigen	77
36	Relative Absorption der Zytotoxizitäts-Assays	78
37	Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Erythrozyten mit SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln	79
38	Übereinander gelegte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder von Caco-2-Zellen mit SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln	79
39	pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit Au-Nanopartikeln	80
40	Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit Au-Nanopartikeln	81
41	Anzahl an Erythrozyten (in %), die nach Au-Nanopartikel-Inkubation eine PS-Exposition zeigen	82
42	Relative Absorption der Zytotoxizitäts-Assays	83
43	Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf sauerstoffbehandelten PU-Fasern	84
44	Durchlicht-Mikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf PU-Fasern	85
45	Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf unbehandelten PU-Fasern, mit verschiedenen Fokustiefen	86
46	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf einer unbeschichteten Glasoberfläche. Aufnahme derselben Probe an verschiedenen Positionen	87
47	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf der SiO <sub>2</sub> -Oberfläche O1 (spin coated)	87
48	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf SiO <sub>2</sub> -Oberflächen O2 bis O5 (dip coated)	88

---

49	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Erythrozyten auf SiO <sub>2</sub> -Oberflächen O6 bis O9 (dip coated)	89
50	Repräsentatives Beispiel des Zeitverlaufs der Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM-markierten Erythrozyten auf der SiO <sub>2</sub> -Oberfläche, hier auf O2	90
51	Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM-markierten Erythrozyten nach 30 min Inkubation mit SiO <sub>2</sub> -Oberflächen	90
52	Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP1	91
53	Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP2	92
54	Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP3	92
55	Aufnahmen von Erythrozyten, inkubiert mit PP4	93
56	pH-Werte von Erythrozyten und Caco-2-Zellen, inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten	94
57	Fluoreszenzintensität von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten	96
58	Anzahl an Erythrozyten (in %), die nach Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten eine PS-Exposition zeigen	98
59	Anteil der hämolysierten Erythrozyten (in %) nach Inkubation mit fluoroalkylierten Phosphaten	98
60	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit DiBAC <sub>4</sub> (3) angefärben Erythrozyten	99
61	Fluoreszenzintensitäten (Mittelwerte) von mit DiBAC <sub>4</sub> (3) inkubierten Erythrozyten	100
62	Kalibrationsgerade von mit Valinomycin inkubierten und DiBAC <sub>4</sub> (3) angefärbten Erythrozyten	101
63	Kalibrationsgerade von mit SQI-Pr inkubierten und DiBAC <sub>4</sub> (3) angefärbten Erythrozyten	101
64	Messung des Membranpotentials von Erythrozyten nach dem Übertragen der Zellen in LIS250	119



**9. Tabellenverzeichnis**

1	Prozentuale Lipidverteilung in der Membran von Erythrozyten	10
2	Geschwindigkeit der Bewegung von Lipiden und Proteinen in der Membran	16
3	Übersicht über die verwendeten Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikel und Komponenten	34
4	Übersicht über die verwendeten SiO <sub>2</sub> -Nanopartikel	36
5	Übersicht über die verwendeten Nanopartikel	36
6	Übersicht über die verwendeten SiO <sub>2</sub> -Oberflächen	38
7	Übersicht über die verwendeten Polypeptide	39
8	Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	43
9	Spannungs-Parameter der Durchflusszytometer-Analyse	55
10	Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikeln	63
11	Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Nanopartikeln	65
12	Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln	75
13	Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit SiO <sub>2</sub> -Nanopartikeln	77
14	Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit Au-Nanopartikeln	80
15	Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit Au-Nanopartikeln	82
16	Fluoreszenzintensität (Mittelwerte) der Erythrozyten nach Inkubation mit den Polypeptiden	93
17	Intrazelluläre pH-Werte (Mittelwerte), inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten	95
18	Fluoreszenz (Mittelwerte) von fluo-4 AM markierten Zellen, inkubiert mit fluoroalkylierten Phosphaten	96

**10. Abkürzungsverzeichnis**

ABC	ATP-bindende Kasette (ATP binding cassette)
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethyl-Ester
ATP	Adenosintriphosphat
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CF	Konversionsfaktor
DiBAC <sub>4</sub> (3)	bis-(1,3-dibutylbarbiturat)trimethinoxonol
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfonyloxid
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Na-Salz
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat-Na-Salz
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence activated cell sorter)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1	Fluoreszenz (FACS)
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HK	Hämatokrit
LDH	Lactatdehydrogenase
LIS	Niedrige Ionenstärke (low ionic strength)
NEM	N-Ethylmaleimid
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger)
NSVDC	Nicht-selektiver spannungsabhängiger Kationen-Kanal (nonselective voltage dependent cation channel)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PP	Polypeptid

PS	Phosphatidylserin
PU	Polyurethan
RNA	Ribonukleinsäure
SM	Sphingomyelin
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter)
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)- 2H-tetrazoliumhydroxid

## 11. Publikationsliste

### Journal-Artikel

Kucherenko YV, Moersdorf D, Lang F, 2009

*Acid-sensitive outwardly rectifying anion channels in human erythrocytes*

J Memb Biol, 230 1-10

Moersdorf D, Hugounenq P, Phuoc LT, Mamlouk-Chaouachi H, Felder-Flesch D, Begin-Colin S, Pourroy G, Bernhardt I, 2010

*Influence of magnetic iron oxide nanoparticles on red blood cells and Caco-2 cells*

Adv Biosc Biotechnol, 1 (5) 439-443

Zandén C, Voinova M, Gold J, Moersdorf D, Bernhardt I, Liu J, 2012

*Surface characterization and interaction with red blood cells of oxygen plasma treated electrospun polyurethane fiber membranes*

Eur Polym J. doi: 10.1016/j.europolymj2012.01.004

### Eingereicht

Kueny-Stolz M, Phuoc LT, Jouhannaud J, Blé FX, Tellier F, Poulet P, Steibel J, Moersdorf D, Bernhardt I, Begin-Colin S, Felder-Flesch D, Puorroy G, 2012

*Toward a multifunctional nano-object for optical and magnetic detections of sentinel node*

Biomaterials, eingereicht

### In Bearbeitung

Moersdorf D, Kueny-Stolz M, Phuoc LT, Begin-Colin S, Felder-Flesch D, Puorroy G, Bernhardt I

*Uptake of iron oxide nanoparticles in cells*

Moersdorf D, Nikolova G, Waton G, Krafft MP, Bernhardt I

*Fluorinated phosphates lead to haemolysis of red blood cells*

### **Vorträge**

Bonsai Symposium, 08.-09. April 2010, Frascati, Italien

Moersdorf D, Hugounenq P, Phuoc LT, Mamlouk-Chaouachi H, Nikolova G, Krafft MP, Waton G, Felder-Flesch D, Begin-Colin S, Pourroy G, Bernhardt I

*Influence of iron oxide magnetite nanoparticles and fluorinated phosphates on red blood cells and Caco-2 cells*

Winter School - Proceed with caution: Concept and application of the Precautionary principle in Nanobiotechnology, 20.-22. Februar 2011, Münster, Deutschland

Moersdorf D, Bernhardt I

*Influence of magnetic iron oxide nanoparticles on cells*

### **Poster**

18<sup>th</sup> Meeting of the European Association for Red Cell Research, 12.-15. Mai 2011, Breslau, Polen

*Influence of iron oxide nanoparticles on red blood cells*

Moersdorf D, Hugounenq P, Phuoc LT, Mamlouk-Chaouachi H, Felder-Flesch D, Begin-Colin S, Pourroy G, Bernhardt I, 2010

8<sup>th</sup> International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN11), 12.-15. Juli 2011, Thessaloniki, Griechenland

*Magnetic and optical nanosystems for the sentinel nodes detection*

Phuoc LT, Kueny-Stolz M, Felder-Flesch D, Begin-Colin S, Pourroy G, Blé FX, Steibel J, Poulet P, Rodriguez P, Vazquez M, Moersdorf D, Bernhardt I

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Daniel Mörsdorf  
Adresse Schillstraße 4, 66113 Saarbrücken  
Geburtsdatum, -ort 19. Juni 1980, Wadern  
Nationalität Deutsch

### Promotion

09/2008-12/2011 Promotion in der Arbeitsgruppe Biophysik/Zentrales Isotopenlabor, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

### Studium und Ausbildung

07/2008 Diplom in Biologie (Dipl. Biol.)  
10/2001-07/2008 Studium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes  
Diplomarbeit: *Physiologische Parameter von Roten Blutzellen unterschiedlichen Alters*, Arbeitsgruppe Biophysik  
08/1999-09/2001 Ausbildung zum Chemielaborant, SaarGummi Deutschland GmbH & Co. KG, Wadern

### Schulbildung

06/1999 Abitur am Hochwaldgymnasium Wadern

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Benutzung anderer als den erwähnten Hilfsmitteln angefertigt habe. Die in der Arbeit verwendeten Zitate und Quellen sind unter als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ingolf Bernhardt für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas, die Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Claus-Michael Lehr für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biophysik für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein Dankeschön geht ebenso an Herrn Prof. Dr. Marc Schneider, Pharmazeutische Nanotechnologie, und Herrn Leon Muijs von der Arbeitsgruppe Biopharmazie und pharmazeutische Technologie für ihre Unterstützung bei jeglichen technischen Problemen im Rahmen der Mikroskopiearbeit.

Danke an die Mitglieder des Konsortiums des EU-Projektes NanoMagDye und hier besonders Frau Prof. Dr. Geneviève Pourroy für die Bereitstellung von Nanopartikeln und die fruchtbare Arbeit im Projekt.

Mein Dank geht außerdem an Frau Dr. Annette Kraegeloh vom Institut für neue Materialien und Herrn Prof. Dr. Marc Schneider für die Überlassung von Nanopartikeln.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Poul Bennekou, Herrn Dr. Stephane Egée und Herrn Dr. Lars Kästner für viele Diskussionen und Anregungen rund um den Erythrozyten.

Ganz besonders bedanken möchte ich bei meinen Eltern Martina und Walter Mörsdorf sowie bei meiner Schwester Anne dafür, dass sie mich jederzeit und in jeglicher Hinsicht unterstützt und gefördert haben.



The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7 2007-2013) under grant agreement nr NMP3-SL-2008-214032.