

**Untersuchung der Veränderungen des Zytoskeletts  
in humanen Lungenmakrophagen in Abhängigkeit  
des Aktivierungszustandes der kleinen Rho-  
GTPasen aufgrund der Interaktionen mit  
synthetischen Nanopartikel**

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

von  
Robert Zarbock

Saarbrücken  
2013

Tag des Kolloquiums: 24.05.2013

Dekan: Prof. Dr. V. Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. A.K. Kiemer  
Prof. Dr. M. Schneider

Vorsitz: Prof. Dr. C. Jacob

Akad. Mitarbeiter: Dr. A. Kraegeloh

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>Abstract</b>	<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>14</b>
1.1 Exposition von Nanopartikeln	15
1.1.1 Allgemeines	15
1.1.2 Inhalative Aufnahme von Nanopartikeln	16
1.1.3 Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers gegen die inhalative Aufnahme von Partikel	17
1.1.4 Humane pulmonal vorkommende Makrophagenklassen	18
1.2 Transportprozesse in die Zelle	19
1.2.1 Endozytose	19
1.2.1.1 Clathrin-abhängige Endozytose	19
1.2.1.2 Der endo-lysosomale Pathway und seine Kompartimente	20
1.2.2 Caveolin-vermittelte Endozytose	21
1.2.3 Phagozytose	22
1.2.3.1 Hintergrund	22
1.2.3.2 Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose	23
1.2.3.3 Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose	24
1.2.3.4 Bildung eines Phagosoms	24
1.3 Das Aktin-Zytoskelett	25
1.4 Kleine Rho-GTPasen	28
1.4.1 Bedeutung der kleinen Rho-GTPasen für die Zelle	28
1.4.2 Rho-GTPasen und <i>membrane traffic</i>	29
1.4.3 Regulatoren der Rho-GTPasen	31
1.5 Das Tubulin-Zytoskelett	33
1.6 NF-κB	36
1.7 NP-induzierte Aktivierung von NF-κB über ROS	37

<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>39</b>
2.1	Zell-Isolation und Zellkultur	40
2.1.1	Enzymlösungen	40
2.1.2	Pufferlösungen	41
2.1.3	Nährmedien	42
2.1.4	Bestimmung der Zellzahl durch Trypanblau-Vitalfärbung	43
2.1.5	Isolation der Makrophagen	44
2.1.5.1	AM-Isolation	44
2.1.5.2	IM-Isolation	45
2.1.5.3	Trypsinierung	46
2.1.6	Kulturbedingungen	46
2.1.7	Zelllinien	47
2.1.7.1	THP-1 – Human acute monocytic leukemia cell line	47
2.1.7.1.1	Einfrieren von THP-1	47
2.1.7.1.2	Auftauen von THP-1	47
2.1.8	Test auf Mykoplasmen	47
2.1.9	Ausdifferenzieren von THP-1	48
2.2	Bakterienkultur	48
2.2.1	Nährmedium	48
2.2.2	Eingesetzter Bakterienstamm	48
2.3	Nanopartikel-Suspensionen	49
2.3.1	ZrO <sub>2</sub> -NP in 10%iger Essigsäure	49
2.3.2	TRIAMO-stabilisierte ZrO <sub>2</sub> -Suspension	49
2.3.3	TODS-stabilisierte ZrO <sub>2</sub> -Suspension	50
2.3.4	Fluoreszenzmarkierte NP-Suspensionen auf Silikabasis	52
2.3.4.1	Allgemein	52
2.3.4.2	PBio.S4	52
2.3.4.3	PBio.S4.PICS750	53
2.3.4.4	PBio.S5	54
2.3.4.5	PBio.S5.PICS750	54
2.4	Vitalitätstest – MTT-Assay	55
2.4.1	Lösungen	55
2.4.2	Verdünnungsreihen der NP-Suspensionen	55
2.4.3	Prinzip des Assays	56

2.4.4	Bestimmung der Vitalität	56
2.5	Limulis-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test)	57
2.6	Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin	58
2.6.1	Lösungen	58
2.6.2	Grundlagen des Assays	60
2.6.3	Durchführung	61
2.7	Dynamische Lichtstreuung	62
2.8	Herstellung von GST-PBD/GST-RBD Sepharose <i>beads</i>	64
2.9	<i>Pulldown Assay</i>	65
2.9.1	Prinzip des Assays	65
2.9.2	Durchführung des Assays	66
2.9.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
2.9.3.1	Lösungen	67
2.9.3.2	Durchführung	68
2.9.4	Western Blot	68
2.9.5	Immundetektion	69
2.9.5.1	Verwendete Antikörper	69
2.9.5.2	Durchführung	70
2.10	Phagozytose-Assay	71
2.11	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) zum Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B	72
2.11.1	Grundlagen zum Assay	72
2.11.2	Lösungen	72
2.11.3	Extraktion der Kernproteine	74
2.11.4	Durchführung	74
2.12	Konfokale Laser-Rastermikroskopie	76
2.12.1	Grundlagen	76
2.12.2	Präparation der Zellen für die Konfokale Laser- Rastermikroskopie	77
2.12.3	Färbung von F-Aktin	78
2.12.4	Zellkernfärbung	78
2.12.5	Immunfärbung von $\alpha$ -Tubulin	79
2.12.6	Eindeckeln der Präparate	79

2.13	Modellierung des intrazellulären Transports von NPs	80
2.14	Statistische Auswertung	81
2.15	Verwendete Software	81
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>83</b>
3.1	MTT-Assay	84
3.1.1	Vorversuch mit Ethanolverdünnungsreihe	84
3.1.2	ZrO <sub>2</sub> -Nanopartikel	85
3.1.3	ZrO <sub>2</sub> /TODS-Nanopartikel	87
3.1.4	ZrO <sub>2</sub> /TRIAMO-Nanopartikel	90
3.2	Phagozytose-Assay	92
3.3	Charakterisierung von Nanopartikeln durch Dynamische Lichtstreuung	94
3.3.1	ZrO <sub>2</sub> -Nanopartikel	94
3.3.2	ZrO <sub>2</sub> /TRIAMO-Nanopartikel	96
3.3.3	ZrO <sub>2</sub> /TODS Nanopartikel	98
3.3.4	Fluoreszenzmarkierte Silika-Nanopartikel	100
3.3.4.1	Allgemein	100
3.3.4.2	PBio.S4 und PBio.S4.PICS750	100
3.3.4.3	PBio.S5 und PBio.S5.PICS750	103
3.4	Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin	105
3.5	Rho-GTPasen <i>Pulldown Assay</i>	109
3.6	Konfokalmikroskopische Untersuchung fluoreszierender Silikapartikel in Makrophagen	114
3.7	Bildbearbeitung konfokalmikroskopischer Aufnahmen	118
3.8	EMSA zum Nachweis eines NP-induzierten Anstiegs an NF-κB in IMs	
3.9	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test	120
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>121</b>
4.1	Vorwort	122
4.2	Interferenzen zwischen Nanomaterialien und <i>in vitro</i> Zellkultur-Assays	122
4.3	Akute Toxizität	125
4.4	Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln in Zellen	126

---

4.5	Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen durch Nanopartikel-Exposition	128
4.6	NP-induzierter Anstieg von NF- $\kappa$ B in humanen <i>Interstitiellen Makrophagen</i>	130
4.7	NP-induzierte Effekte auf die Organisation der Mikrotubuli	131
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>161</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>163</b>

## Zusammenfassung

Metalloxide sind die derzeit wichtigsten kommerziell verarbeiteten Nanopartikel (NPs). Ziel dieser Arbeit war es, synthetisch hergestellte NPs auf Silika- und Zirkoniumdioxid-Basis zu charakterisieren und Interaktionen mit vor allem humanen *Alveolarmakrophagen* zu untersuchen. In Makrophagen konnte *via* MTT-Test erst bei hohen Konzentrationen eine akute Toxizität durch ZrO<sub>2</sub>-NPs nachgewiesen werden. Mikroskopische Aufnahmen von perinukleär lokalisierten Teilchenclustern der untersuchten SiO<sub>2</sub>-NPs wurden als Grundlage zur Erforschung der intrazellulären Teilchen-Dynamik verwendet. Die Quantifizierung des für die meisten zellulären Aufnahmeprozesse essentiellen F-Aktins ergab nach Inkubation mit NPs einen Anstieg des fibrillären Aktinergehalts. Als zentrale Regulatoren der Aktin-Dynamik wurden die *kleinen Rho-GTPasen* (*RhoA*, *Rac1* und *Cdc42*) auf einen veränderten Aktivierungsgrad nach Inkubation mit SiO<sub>2</sub>-NPs untersucht. Ob und wie stark die *Rho-GTPasen* aktiviert wurden, war dabei abhängig von der jeweils zu betrachtenden GTPase, Oberflächenmodifikation und Konzentration der Partikel, sowie der jeweiligen Zellspezies. In humanen *Interstitiellen Makrophagen* konnte nach Exposition von *nicht-PEGylierten* SiO<sub>2</sub>-NPs *via* EMSA eine erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Toxizität und das inflammatorische Potential der verwendeten Nanomaterialien realistisch einzuschätzen.



## Abstract

There is an increasing exposition of humans to engineered Nanoparticles (NPs) that are present in a wide range of commercially available products, consisting of metal oxides representing actually the commercially most important NPs. Aim of this dissertation was to characterize technical silica and zirconium nanoparticles and to investigate the interactions with human lung macrophages. In macrophages, an acute toxicity was shown for zirconia NPs in high concentrations after an incubation time of 24 hours. Based on the microscopic images, it has been possible to develop a stochastic simulation of particle transport and particle dynamics in macrophages. Quantification of F-actin resulted in an increase after incubation with *PEGylated* and *non-PEGylated* silica NPs. The *small Rho-GTPases* (*RhoA*, *Rac1* and *Cdc42*) play a pivotal role in regulating actin dynamics. Degree of activation depended on the selection of cell species, GTPase, surface modification and concentration of NPs. Investigations had to be carried out about how far *small Rho-GTPases* in macrophages are able to activate NF- $\kappa$ B after incubation with NPs. Results of EMSAs performed with interstitial macrophages incubated with *non-PEGylated* silica NPs showed an increase in NF- $\kappa$ B activation. Investigations in the context of this work are absolutely essential for the safe handling with nanomaterials. The findings are supposed to provide assessment of toxicity and inflammatory potential of the used nanomaterials.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ADP</b>	<b>Adenosindiphosphat</b>
<b>AM</b>	<b>Alveolarmakrophage</b>
<b>AP-1</b>	<b>Aktivatorprotein-1</b>
<b>APS</b>	<b>Ammoniumperoxodisulfat</b>
<b>ARP</b>	<b>Actin related protein</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosintriphosphat</b>
<b>BAT</b>	<b>Biologischer Arbeitsplatztoleranzwert</b>
<b>BSA</b>	<b>Bovines Serumalbumin</b>
<b>BSSB</b>	<b>Balanced Salt Solution B</b>
<b>CCV</b>	<b>Clathrin-coated vesicle</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of differentiation</b>
<b>CHO</b>	<b>Chinese Hamster Ovary</b>
<b>CLSM</b>	<b>Confocal Laser Scanning Microscopy</b>
<b>CRM</b>	<b>Controlled Reference Method</b>
<b>CytD</b>	<b>Cytochalasin D</b>
<b>DC</b>	<b>Dendritische Zelle</b>
<b>DFG</b>	<b>Deutsche Forschungsgemeinschaft</b>
<b>DLS</b>	<b>Dynamische Lichtstreuung</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<b>DNA</b>	<b>Deoxyribonucleic acid</b>
<b>DPSS</b>	<b>diode pumped solid state</b>
<b>DTT</b>	<b>Dithiothreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>
<b>EGF-R</b>	<b>Epidermal growth factor receptor</b>
<b>EGTA</b>	<b>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure</b>
<b>Em</b>	<b>Emission</b>
<b>EMSA</b>	<b>Electrophoretic mobility shift assay</b>
<b>EU/ml</b>	<b>Endotoxin units per mL</b>
<b>Ex</b>	<b>Extinktion</b>
<b>Fc</b>	<b>Fragment crystalline</b>

<b>FcR</b>	<b>Fc-Rezeptor</b>
<b>FCS</b>	<b>Fetal calf serum</b>
<b>FITC</b>	<b>Fluoresceinisothiocyanat</b>
<b>fMLP</b>	<b>fMet-Leu-Phe</b>
<b><i>g</i></b>	<b>Gravitational force</b>
<b>GAP</b>	<b>GTPase-activating proteins</b>
<b>GDI</b>	<b>Guanin nucleotide exchange/dissociation inhibitors</b>
<b>GDP</b>	<b>Guanosindiphosphat</b>
<b>GEF</b>	<b>Guanin nucleotide exchange factors</b>
<b>GST</b>	<b>Glutathion S-Transferase</b>
<b>GTP</b>	<b>Guanosintriphosphat</b>
<b>GTP<sub>γ</sub>S</b>	<b>Guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphat</b>
<b>HeNe</b>	<b>Helium-Neon-Laser</b>
<b>HEPES</b>	<b>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</b>
<b>hMSCs</b>	<b>humane mesenchymale Stammzellen</b>
<b>HUVECs</b>	<b>Human Endothelial Cells</b>
<b>IEP</b>	<b>Isoelektrischer Punkt</b>
<b>IgG</b>	<b>Immunglobulin G</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukin</b>
<b>IM</b>	<b>Interstitieller Makrophage</b>
<b>IPTG</b>	<b>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</b>
<b><i>kDa</i></b>	<b>Kilodalton</b>
<b>LAL</b>	<b>Limulus-Amöbozyten-Lysat</b>
<b>LBs</b>	<b>Latexbeads</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolysaccharide</b>
<b>mA</b>	<b>Milliampere</b>
<b>MAK</b>	<b>Maximale Arbeitsplatz-Konzentration</b>
<b>MAP</b>	<b>Microtubule-associated protein</b>
<b>MHC</b>	<b>Major Histocompatibility Complex</b>
<b>min</b>	<b>Minute(n)</b>
<b>MPS</b>	<b>Mononukleäres Phagozytensystem</b>
<b>MT</b>	<b>Mikrotubuli</b>
<b>MTOC</b>	<b>Microtubule-organizing-center</b>
<b>MTT</b>	<b>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-</b>

	<b>tetrazoliumbromid</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</b>
<b>NF-κB</b>	<b>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</b>
<b>NHS</b>	<b>N-Hydroxysuccinimid</b>
<b>NLR</b>	<b>NOD-like receptor</b>
<b>NP</b>	<b>Nanopartikel</b>
<b>OD</b>	<b>Optische Dichte</b>
<b>PAK1</b>	<b>p21 Aktivierten Kinase 1</b>
<b>PAMP</b>	<b>Pathogen-associated molecular pattern</b>
<b>PBD</b>	<b>p21-binding domain</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate buffered saline</b>
<b>PBST</b>	<b>Phosphate buffered saline with Tween<sup>®</sup> 20</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase chain reaction</b>
<b>PEG</b>	<b>Polyethylenglycol</b>
<b>PI3-Kinase</b>	<b>Phosphoinositid-3-Kinase</b>
<b>PICS</b>	<b>3-Isocyanatopropyltriethoxysilan</b>
<b>PKC</b>	<b>Proteinkinase C</b>
<b>PMA</b>	<b>Phorbol-12-Myristat-13-Acetat</b>
<b>PMSF</b>	<b>Phenylmethylsulfonylfluorid</b>
<b>PRR</b>	<b>Pattern-recognition receptors</b>
<b>PVDF</b>	<b>Polyvinylidenfluorid</b>
<b>QD</b>	<b>Quantum Dot</b>
<b>RBD</b>	<b>Rho binding domain</b>
<b>RIG-I</b>	<b>Retinoic acid inducible gene - I</b>
<b>RNS</b>	<b>Reaktive nitrogen species</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive oxygen species</b>
<b><i>rpm</i></b>	<b>rotations per minute</b>
<b>RPMI</b>	<b>Roswell Park Memorial Institute</b>
<b>RT</b>	<b>Raumtemperatur</b>
<b>SAGM</b>	<b>Small airways growth medium</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</b>
<b>SEM</b>	<b>Standardfehler (Standard Error of the Mean)</b>

<b>SNARE</b>	<b>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein receptor</b>
<b>TBE</b>	<b>TRIS-Borat-EDTA-Puffer</b>
<b>TEM</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie</b>
<b>TEMED</b>	<b>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin</b>
<b>TEOS</b>	<b>Tetraethylorthosilicat</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Transformin growth factor beta</b>
<b>THP-1</b>	<b>Human acute monocytic leukemia cell line</b>
<b>TLR</b>	<b>Toll-like-Rezeptor</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumor-Nekrose-Faktor alpha</b>
<b>TODS</b>	<b>3,6,9-Trioxadecansäure</b>
<b>TRIAMO</b>	<b>3-[2-(Aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilan</b>
<b>TRIS/Tris</b>	<b>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol</b>
<b>TRITC</b>	<b>Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat</b>
<b>U</b>	<b>Unit</b>
<b>UPA</b>	<b>Ultrafine Particle Analyzer</b>
<b>WASP</b>	<b>Wiskott–Aldrich Syndrome Protein</b>
<b>WST</b>	<b>Water soluble Tetrazolium</b>

## **1. Einleitung**

## 1.1 Exposition von Nanopartikeln

### 1.1.1 Allgemeines

Seit jeher wurde der Mensch im Laufe der Evolution gegenüber Partikel im nanoskaligen Bereich exponiert. Entstanden ehemals die Nanopartikel (NPs) überwiegend auf natürlichem Wege, wie z.B. durch Waldbrände, so rückten die durch anthropogene Einflüsse generierten NPs seit der Industrialisierung im vorletzten Jahrhundert und die damit verbundene Freisetzung von Feinstäuben (z.B. durch Verbrennung von fossilen Brennstoffen) in dramatischem Ausmaß immer mehr in den Vordergrund der toxikologischen Betrachtung (Oberdörster et al., 2005).

Ein Nanomaterial in der Definition der EU-Kommission wird beschrieben als „ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 Prozent der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben“ (Hessisches Ministerium für Wirtschaft, Verkehr und Landesentwicklung, [www.hessen-nanotech.de](http://www.hessen-nanotech.de); DNR, [www.eu-koordination.de](http://www.eu-koordination.de)).

Diese Arbeit ist auf die Untersuchung von synthetischen NPs gerichtet, wie sie gezielt in einer zunehmenden Anzahl von Anwendungen eingesetzt werden. Obgleich die rasche Expansion der Nanotechnologie sehr viele Vorteile mit sich bringt, so birgt sie möglicherweise Gefahren in sich, deren Mechanismen und Tragweite bislang nur teilweise bekannt und bedingt abschätzbar sind (Oberdörster et al., 2007).

Laut Angaben des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) beträgt das Weltmarktvolumen für „durch Nanotechnologie beeinflusste Produkte“ fast 150 Mrd. US-Dollar (BMBF 2010). Somit konnte sich die Nanotechnologie in nahezu allen Bereichen etablieren und gehört nach wie vor zu einer der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Die damit verbundenen Hoffnungen sind entsprechend groß, das enorme Innovationspotential und die permanente Weiter- und Neuentwicklung einer beinahe endlosen Palette an Produkten aus den unterschiedlichsten Bereichen

kontinuierlich auszuweiten (Luther, W. /Malanowski, N. et. al., 2004; BMBF 2004, 2010; Gleiche et al. 2006; Miller et al. 2006; Morrison et al., 2006; Wagner et al. 2006; Heubach et al., 2006).

Im Umgang mit Nanopartikeln und „durch Nanotechnologie beeinflusste Produkte“ wird natürlich spätestens mit der Erkenntnis der NP-Aufnahme in den menschlichen Körper, sowie dem stets wachsenden Anteil solcher Materialien in Industrie und Medizin, insbesondere zum Schutz von Mensch und Umwelt, immer mehr die Kompatibilität der NPs mit lebenden Systemen in Frage gestellt (Leydecker, 2008; Oberdörster et al. 2005; Hanselmann, 2007).

### **1.1.2 Inhalative Aufnahme von Nanopartikeln**

Unter den zahlreichen Möglichkeiten, vom menschlichen Körper aufgenommen zu werden, spielt die Lunge eine besonders herausragende Rolle. Sie bietet einen großflächigen, ca. 140 m<sup>2</sup> umfassenden Expositionsbereich mit einer nur einige hundert Nanometer dünnen Luft-Blut Gewebeschanke in der Gasaustauschregion und prädestiniert diese somit für derartige Stoffe als ideales Einstiegsportal in das Körperinnere, zumal NPs bekanntlich bis in die Alveolen vordringen können (Gehr et al., 1978; Oberdörster et al., 2005; Peters et al., 2006).

Haben die NPs erst einmal die Epithelien und das Interstitium überwunden, werden sie über das kardiovaskuläre System deportiert und sind als Folge in anderen Organen nachzuweisen (Nemmar et al., 2002; Geiser et al., 2005; Koch et al., 2005). Diverse tierexperimentelle Studien zeigen, dass nach Inhalation der NPs ein Transfer dieser NPs von der Lunge in andere Organe wie Leber, Gehirn, Herz und Nieren nachweisbar ist (Takenaka et al., 2001; Kreyling et al., 2002; Oberdörster et al., 2002, 2004).



### **1.1.3 Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers gegen die inhalative Aufnahme von Partikel**

Um der systemischen Verteilung inhalierter Partikel, Antigene und Pathogene entgegen zu wirken, bedient sich der Körper diverser Abwehrmechanismen, angefangen bei den im oberen Respirationstrakt lokalisierten Kinocilien (Thews/Mutschler/Vaupel, 2007). Eingeatmete sphärische Partikel ab einem Durchmesser von 2,5  $\mu\text{m}$  werden verstärkt durch die turbulente Luftströmung mit der feuchten Schleimhautmukosa in Kontakt gebracht. Die auf deren Epithelzellen vorliegenden Kinocilien transportieren die inhalierten Partikel in Richtung Mund- und Rachenraum. In Kombination mit dem Hustenreflex wird somit eine sehr effiziente Elimination erzielt (Hoet et al., 2004; Thews/Mutschler/Vaupel, 2007).

Erleichtert wird die Beseitigung von vermeintlichen Pathogenen und Fremdpartikeln durch die Schleimproduktion der Becherzellen im respiratorischen Epithel der Bronchialschleimhaut (Alberts et al., 2004). In den tiefer gelegenen Bronchioli übernehmen sogenannte Clara-Zellen die sekretorische Funktion und sondern einen proteolytischen Schleim ab (Leonhardt, 1990).

Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 2,5  $\mu\text{m}$  vermögen inhalativ bis in die Alveolen vorzudringen. Das Ausmaß der dortigen Verteilung und Deposition hängt jedoch auch unterhalb der 2,5  $\mu\text{m}$ -Grenze vom jeweiligen Durchmesser der Partikel ab. So sind sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm am effizientesten, was die Deposition im alveolären Bereich angeht. Bei Partikeln, deren aerodynamischer Durchmesser 1  $\mu\text{m}$  unterschreitet, findet die Deposition während der Inhalation größtenteils bereits im nasopharyngealen Bereich statt (Hoet et al., 2004; Oberdörster et al., 2005).

Im Bereich der Alveolen sind Pneumozyten Typ II (Nischenzellen) sekretorisch aktiv und produzieren den Surfactant, welcher das Alveolarlumen auskleidet. Als „Surfactant“ wird der auf der Alveolaroberfläche, von der Hypophase unterlegte Phospholipidfilm bezeichnet, der als Detergens die Oberflächenspannung und somit die Kohäsionskräfte herabsetzt. (Leonhardt, 1990).

#### 1.1.4 Humane pulmonal vorkommende Makrophagenklassen

In den Bronchioli terminales (Alveolen) findet man die für die Immunabwehr äußerst wichtige Zellpopulation der Makrophagen. Unterteilt werden diese in den terminalen Abschnitten der Atemwege lokalisierten Zellen des „Mononukleären Phagozytensystems“ (MPS) in die Makrophagenklassen „Alveolarmakrophagen“, „Intravaskuläre Makrophagen“ an den Endothelzellen der Kapillaren und „Interstitielle Makrophagen“ (Lohmann-Matthes et al., 1994; Schneberger et al., 2010). Weiterhin an der Immunabwehr beteiligt sind die Dendritischen Zellen (DCs). DCs besitzen trotz gleicher Abstammung wie die mononukleären Phagozyten unterschiedliche Eigenschaften. Sie sind in der Antigenpräsentation effizienter und leiten eine adaptive spezifische Immunantwort ein, wohingegen Monozyten und Makrophagen die ausschlaggebenden Regulatoren des angeborenen Immunsystems sind (Lohmann-Matthes et al., 1994; Kaufmann, 2009; Schneberger et al., 2010).

Alveolarmakrophagen bilden die bisher wohl am besten untersuchte pulmonale Makrophagenklasse. Mit ihrer Lokalisation auf der luminalen Oberfläche der Alveolen bilden sie als *first line defence* mit einer ausgesprochen hohen Phagozytoserate die erste Barriere gegen inhalierte Partikel. Ein essentielles Kriterium zur Charakterisierung verschiedener Makrophagenklassen wird von den auf der Zelloberfläche exprimierten, immunphänotypischen *Clusters of differentiation* (CDs) bestimmt.

## 1.2 Transportprozesse in die Zelle

Allgemein ist die Aufnahme externer Partikel, Bakterien, Viren, extrazelluläre Moleküle, Lösungen, etc. in die Zelle untergliedert in Endozytose, Phagozytose, Pinozytose und Aufnahme durch Diffusion, bzw. in Rezeptor-abhängige und Rezeptor-unabhängige Vorgänge, die wiederum meist von der Größe des zu internalisierenden Partikels abhängig sind (Peters et al., 2006).

Zahlreiche Studien belegen die Aufnahme von nanoskaligen Partikeln in das Innere unterschiedlicher Zelltypen (Takenaka et al., 2006; Gratton et al., 2008). Sukzessive werden die verantwortlichen Aufnahmemechanismen korreliert (Iversen et al., 2011) und versucht, diesbezüglich in Abhängigkeit der Partikelgröße und deren Oberflächenbeschaffenheit Aussagen zu treffen (Chithrani und Chan, 2007). Erwiesenermaßen spielt die Endozytose eine zentrale Rolle bei der Aufnahme von NPs in die Zelle (Iversen et al., 2011).

Die einzelnen Aufnahmemechanismen (Abbildung 1.2a) sollen zum besseren Verständnis der daraus resultierenden unterschiedlichen Konsequenzen auf molekularbiologischer Ebene im Folgenden genauer erläutert werden:

### 1.2.1 Endozytose

#### 1.2.1.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Ein klassisches Beispiel für die Clathrin-abhängige Endozytose ist die Aufnahme von Proteinen. Mit Bindung eines solchen Liganden an den entsprechenden Rezeptor initiiert dieser die Invagination, bzw. Bildung eines Clathrin-beschichteten Vesikels (*Clathrin-coated vesicles*, CCV). Dieser Prozess forciert anschließend im Zuge des endosomalen Pathways eine Polymerisation der Clathrinmoleküle über Adapterkomplexe (AP1-AP4) und ermöglicht die für eine Clathrinhülle charakteristische Käfigstruktur (Kirchhausen, 2000, 2002; Pearse et al., 2000). Die Rekrutierung einiger akzessorischer und regulatorischer Proteine im Endozytoseprozess ist ebenfalls den Adapterkomplexen zuzuschreiben. Zu

Proteinen dieser Art zählt man z.B. Epsin und Amphiphysin zu Beginn des *coat assembly* (Traub et al., 1999; Owen et al., 1999), die GTPase Dynamin zur Abschnürung neu gebildeter Vesikel (Hinshaw und Schmid, 1995; Schmid et al., 1998; Henley et al., 1999; Chappie et al., 2009), aber auch SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein receptor*), um spätere Membranfusionen zu katalysieren (Nichols et al., 1997; Skehel und Wiley, 1998).

### 1.2.1.2 Der endo-lysosomale Pathway und seine Kompartimente

Die maßgeblichen endozytotischen Kompartimente lassen sich in drei Gruppen einteilen: frühe Endosomen (*early endosomes*), späte Endosomen (*late endosomes*) und Lysosomen (Perret et al., 2005).

Ist das Vesikel erst einmal von der Plasmamembran abgeschnürt, findet ein enzymatisch herbeigeführtes „uncoating“ der Clathrin-Hülle statt, worauf in einem als „Reifung“ bezeichneten Prozess das so entstandene Endosom entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts ins Zellinnere transportiert wird, um dort letztlich mit Lysosomen zu verschmelzen (Ungewickell, 1999).

Neben den Mikrotubuli ist in diesem Zusammenhang F-Aktin als ein weiterer Bestandteil des Zytoskeletts maßgeblich an der endo-lysosomalen Vesikelbewegung im Zytoplasma beteiligt (Taunton, 2001; Toret and Drubin, 2006; Schauer et al., 2010). Die mit dem Prozess der Endozytose einhergehende Beeinflussung der physikalischen Membraneigenschaften wie Härte, Elastizität, Krümmung und Spannung kann maßgeblich vom Membran-assoziierten Aktingerüst und Motorproteinen moduliert werden. Die Polymerisierung von F-Aktin im Bereich der Membranen wird durch Formine und dem ARP2/3 Komplex reguliert. ARP2/3 wird wiederum von den Aktin-Nukleationsfaktoren der WASP-Familie aktiviert, die ihrerseits von von Rho-GTPasen und deren Effektoren aktiviert werden. Jedoch kann die Endozytose in Säugetierzellen auch in Abwesenheit von F-Aktin erfolgen (Anitei und Hoflack, 2012).

Alle Organellen, die durch *uncoating* der Clathrin-Hülle oder durch Clathrin-unabhängige Aufnahmemechanismen von der Zelle internalisiert wurden (z.B.

pinozytotische Vesikel), bezeichnet man als „frühe Endosomen“ (*early endosomes*), bzw. synonym auch *sorting endosomes*, aufgrund der ersten „Sortierung“ des aufgenommenen Materials im Innern der genannten frühen Endosomen. Die zisternenartigen, tubulären und vesikulären Bereiche verleihen diesen Kompartimenten einen stark pleomorphen Charakter (Sheff et al., 1999).

Besonderheit der späten Endosomen und Lysosomen ist der darin vorherrschende saure pH-Wert. Zudem weisen späte endosomale Kompartimente in hämatopoetischen Zellen sekretorisches Potential auf (Blott und Griffiths, 2002), was hinsichtlich der Antigenpräsentation von großer Relevanz ist, da die Antigenpräsentierenden MHC II-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*) in den zur Fusion mit der Plasmamembran fähigen azidischen Vesikeln beladen werden (Raposo et al., 1996; Boes et al., 2002; Chow et al., 2002).

Ausschließlich im sauren Bereich aktive Hydrolasen wie Proteasen, lysosomale Nukleasen und Phosphatasen katalysieren in den Lysosomen bei einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5, also in einem deutlich saureren Milieu als in den späten Endosomen, den enzymatischen Abbau von Proteinen und Partikeln. Der intralysosomal benötigte niedrige pH-Wert wird dabei durch Protonenpumpen gewährleistet (Bainton, 1981; Alberts, 4. Auflage)

### 1.2.2 Caveolin-vermittelte Endozytose

Unter einer Caveolin-vermittelten Endozytose versteht man einen zwar Clathrin-unabhängigen, jedoch Dyamin-abhängigen Aufnahmemechanismus. Neben den Caveolin-Proteinen sind die 50 – 80 nm messenden Caveolae reich an Sphingolipiden und Cholesterol. Caveolae dienen zur endozytotischen Aufnahme von Pathogenen, aber auch  $\beta$ 1-Integrine und andere Proteine können über diesen Weg von Zellen internalisiert werden. Morphologisch sind Caveolae als charakteristisch flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran zu erkennen. Das für ihre Genese essentiell wichtige Caveolin1 bildet Komplexe aus 14 – 16 Monomeren und vermag Cholesterol und Glucosphingolipide zu binden. Besonders interessant in Bezug auf die kleinen Rho-GTPasen ist die Beobachtung, dass die

Depletion von Caveolin1 eine erhöhte Aktivität von Cdc42 nach sich zieht (Parton and Simons, 2007; Doherty and McMahon, 2009).

Der über diesen Weg aufgenommene Inhalt der Caveolae führt nach der Bildung und dem Transport in Caveosomen zur Verschmelzung mit dem Golgi-Apparat, dem Endoplasmatischen Reticulum oder den frühen Endosomen und somit zu dem in Kapitel 1.2.1.2 geschilderten endo-lysosomalen Pathway. (Mayor and Pagano, 2007).

### 1.2.3 Phagozytose

#### 1.2.3.1 Hintergrund

Die Phagozytose beschreibt die Aktin-abhängige, Clathrin-unabhängige Internalisierung von Partikeln in der Größenordnung 0,5 bis 5  $\mu\text{m}$  (Kaplan, 1977).

Um „fremde“/Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) von körpereigenen Strukturen unterscheiden zu können, exprimieren Antigen-präsentierende Zellen, wie z.B. die Makrophagen diverse Rezeptoren, die sog. *pattern-recognition receptors* (PRRs; Sastry and Ezekowitz 1993; Gordon 2002). Neben dem Reiz zur Phagozytose können PRRs auch weitere Zellaktivitäten ermöglichen oder die Freisetzung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren aus Phagozyten stimulieren (Egger, 2005). Generell sind die PRRs unterteilt in „Lösliche PRRs“ (z.B. Mannose-bindendes Lektin), Intrazelluläre PRRs, wie RIG-I-ähnliche Proteine oder *NOD-like receptors* (NLRs), die der Mobilisierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und dem Interleukin-1-stimulierenden Enzym Caspase-1 dienen, sowie Oberflächen-PRRs, zu denen neben den C-Typ Lektin-Rezeptoren und Scavenger-Rezeptoren auch die wohl am besten erforschten PRRs, nämlich die u. a. NF- $\kappa$ B aktivierenden Toll-like-Rezeptoren (TLRs) gehören, von denen beim Menschen zehn Isoformen gefunden wurden (Platt et al., 1998; Stahl und Ezekowitz, 1998; Aderem und Ulevitch, 2000; Akira et al., 2001).

Eines der bekanntesten Beispiele in diesem Zusammenhang ist die auf TLR4 basierende, LPS-induzierte Immunantwort (Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999) durch Makrophagen unter Freisetzung des Interferons IFN- $\gamma$ , verschiedener Interleukine (IL-1 $\beta$ ; IL-12) und Stickstoffmonoxid (Jones et al., 2001).

### 1.2.3.2 Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose

Werden fremde Strukturen von Immunglobulinen opsoniert, so binden besagte Immunglobuline mit ihrem jeweiligen Fc-Teil am Fc-Rezeptor (FcR) des Phagozyten, wodurch die Internalisierung induziert wird (Ravetch, 1997; Ravetch und Clynes, 1998), d.h. die an der Plasmamembran mit den posttranslational modifizierten N-Termini verbundenen Kinasen der Src-Familie bewirken, ausgelöst durch die Interaktion von FcR und Ligand, eine in Konformationsänderung resultierende Phosphorylierung spezifischer Tyr-Reste im Rezeptor (Ghazizadeh et al., 1994; Isakov, 1997).

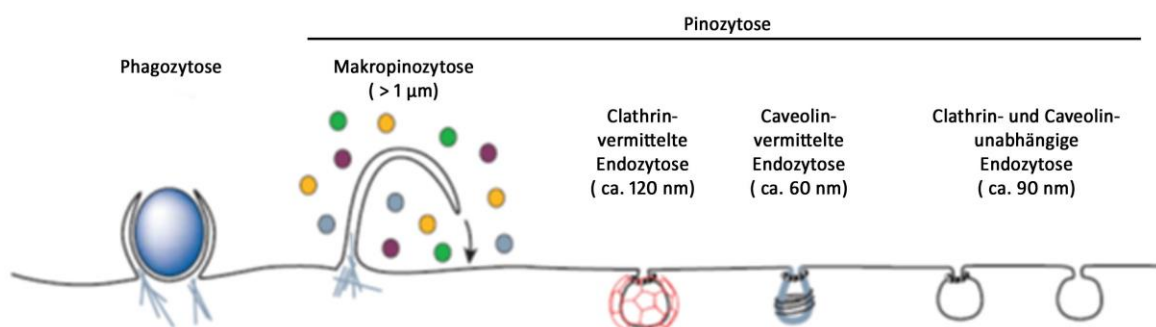
Dies leitet als Folge eine Rekrutierung der „kleinen GTPasen“, Rac1 und Cdc42 ein (Caron und Hall, 1998). Rac1 und Cdc42 sind kleine Rho-GTPasen, so genannte „Molekulare Schalter“, die im Zusammenspiel mit einer Reihe an Effektormolekülen, so z.B. Mitglieder der Proteinfamilie WASP, die in Verbindung mit dem Arp2/3-Komplex (May et al., 2000), eine Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und somit die Internalisierung des Partikels steuern (Massol et al., 1998). Im weiteren Verlauf wirken mehrere Kinasen, wie die PI3-Kinase (Ninomiya et al., 1994), Proteinkinase C (PKC) (Zheleznyak und Brown, 1992; Brown, 1995), aber auch Motorproteine der Myosin-Familie (Stendahl et al., 1980; Swanson et al., 1999) regulierend auf die „Phagosomen-Reifung“ ein. Um in den späten Stadien der Immunantwort pathogene Keime abtöten zu können, sind Makrophagen durch die FcR-vermittelte Phagozytose dazu befähigt, reaktive Sauerstoffspezies oder Arachidonsäurederivate freizusetzen (Aderem et al., 1985; Wright und Silverstein, 1983).

### 1.2.3.3 Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose

Bei der Komplementrezeptor-vermittelten Phagozytose erfolgt, anders als bei der FcR-vermittelten Phagozytose, keine Bildung deutlicher Membranprotrusionen. Stattdessen „sinken“ die opsonisierten Pathogene vielmehr in den Phagozyten ein (Caron und Hall 1998; Kaplan, 1977), nachdem  $\alpha M/\beta 2$ -Integrin auf der Phagozytenoberfläche das Komplement-Fragment C3bi erkannt hat und dadurch die Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose induziert. Auch bei dieser Variante der Phagozytose ist die dynamische Regulation des Aktin-Zytoskeletts von enormer Wichtigkeit. Die erforderliche Aktinnukleation und Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes werden maßgeblich von einer von Rho-GTPasen und deren Effektoren gesteuerten Kaskadenreaktion bestimmt (siehe Kapitel 1.4.1) (May et al., 2000).

### 1.2.3.4 Bildung eines Phagosoms

Nach der Internalisierung interagiert das Phagosom mit verschiedenen Kompartimenten des endo-lysosomalen Pathways. Es findet eine Fusion von Phagosom und Lysosomen statt und somit die Bildung eines Phagolysosoms, worauf eine Degradation der aufgenommenen Partikel erfolgt. In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der phagozytierten Pathogene oder Partikel kann sich die Dauer bis zur Verschmelzung bzw. des Abbaus von einer halben bis hin zu mehreren Stunden erstrecken (Pitt et al., 1992; Racoosin und Swanson, 1993; Desjardins et al., 1994).



**Abbildung 1.2a:** Darstellung der in Kapitel 1.2 aufgeführten multiplen Aufnahmewege in die Säugerzelle in Abhängigkeit der Vesikelgröße, bzw. -genese, Beschaffenheit des jeweiligen Partikels (aus Conner und Schmid, 2003, modifiziert).



### 1.3 Das Aktin-Zytoskelett

Aktin ist neben den Mikrotubuli und Intermediärfilamenten ein grundlegender Bestandteil des Zytoskeletts und spielt eine gravierende Rolle für die mechanische und morphologische Stabilität der Zelle. Das Aktin-Zytoskelett ist aber auch an dynamischen Prozessen wie Endozytose/Phagozytose, Motilität, Zellteilung, Kontraktion, Adhäsion oder aber intrazellulärer Positionierung von Zellorganellen beteiligt (Leonhardt, 1990). In höheren Eukaryoten findet man multiple Isoformen des Proteins mit jeweils unterschiedlichen Aufgaben.  $\alpha$ -Aktin ist hauptsächlich als Bestandteil kontraktile Strukturen in Muskelzellen vorzufinden, wogegen  $\beta$ -Aktin vornehmlich in Nicht-Muskelzellen exprimiert wird. Globuläre Aktin-Monomere (G-Aktin) polymerisieren zu polaren Filamenten (F-Aktin), welche ihrerseits in diversen Strukturen organisiert sind und einer kontinuierlichen Depolymerisation unterliegen. Daher bildet sich ein für die Funktionsfähigkeit der Zelle bzw. des gesamten Organismus überlebenswichtiges, dynamisches Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin, bestimmt durch die Polymerisationsrate an Plus- und Minus-Enden der Filamente und somit Grundlage für den adaptiven Charakter des Aktin-Zytoskeletts (May et al., 2001; Alberts et al., 2004; Winder S. J. et al., 2005).

Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente in einer Zelle werden durch eine ganze Reihe von Faktoren kontrolliert. Jedes Aktin-Molekül verfügt über eine Bindungsstelle für ein ATP bzw. ADP und damit einhergehend eine adäquate intrinsische ATPase-Aktivität. Bei der sukzessiven Anlagerung der Aktin-Monomere an bestehende Aktin-Filamente wird durch die vorgegebene Polarisierung eine favorisierte Orientierung bzgl. der Assoziation neuer Aktin-Untereinheiten an den Plus-Enden (*barbed ends*) forciert. Minus-Enden (*pointed ends*) wachsen langsamer und werden *via* Netto-Depolymerisation abgebaut. Entspricht die Assoziationsrate der Dissoziationsrate, spricht man von einem „Tretmühlen-Effekt“ (*treadmilling*), d.h. die Aktin-Filamente können ohne ein Netto-Wachstum ihre Position in der Zelle verändern (Alberts et al., 2004; May et al., 2001; Winder und Ayscough, 2005).

*Capping*-Proteine blockieren mit Bindung an das Minus-Ende eines Aktin-Filaments die Depolymerisation und stabilisieren somit das jeweilige Filament, wohingegen am Plus-Ende bindende *Capping*-Proteine wie das Gelsolin eine Polymerisation

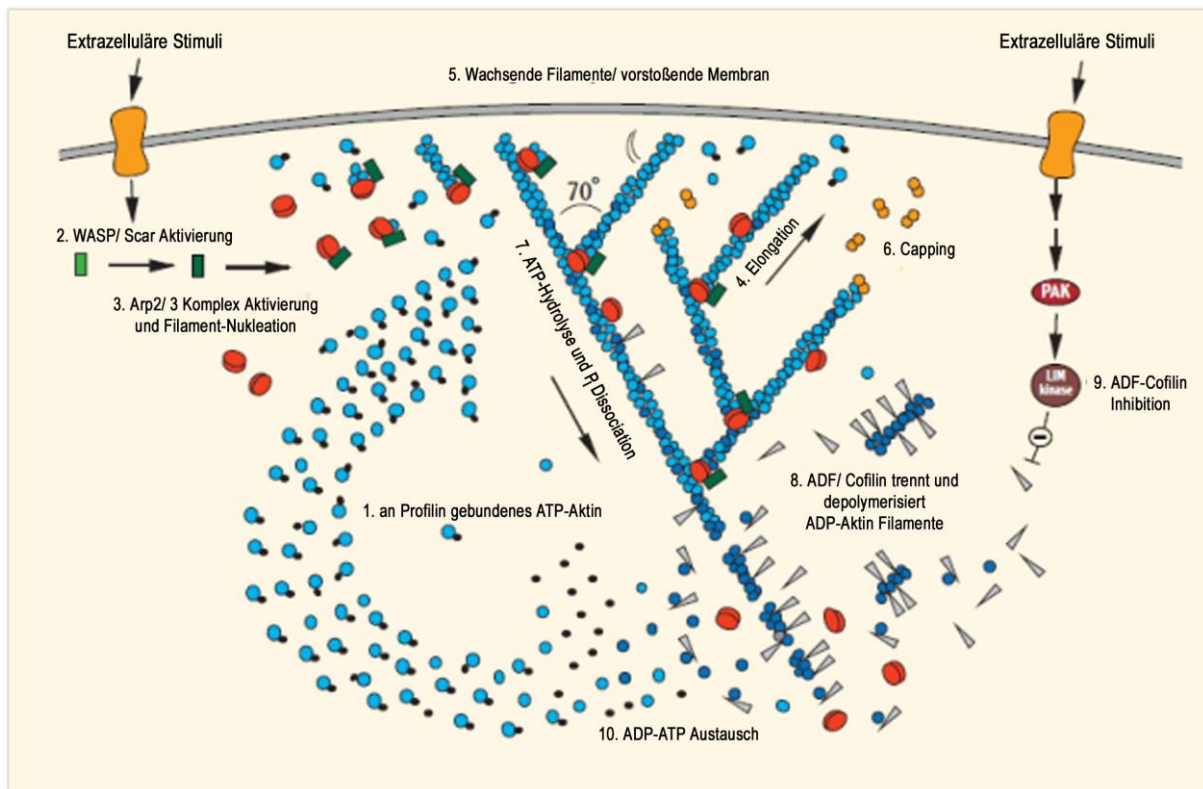
inhibieren und folglich eine Depolymerisation der Filamente herbeiführen oder bei helikaler Anlagerung Filamentbrüche verursachen können (Yin et al., 1981).

Ein weiterer am Plus-Ende des Filaments angreifender Regulator der Aktin-Polymerisation mit einer beispielhaften Schlüsselrolle als signifikanter Aktin-Nukleationsfaktor ist der aus sieben Untereinheiten zusammengesetzte stabile Proteinkomplex Arp2/3, bestehend aus den beiden, die verschiedenen Spezies betreffend hoch konservierten, *Actin Related Proteins* (aktinverwandte Proteine) Arp2 und Arp3, dem ebenfalls hoch konservierten Protein p20-Arc und den vier weniger hoch konservierten Proteinen p41-, p34-, p21- und p16-Arc (Machesky et al., 1994; ten Klooster et al., 2006).

Die Migration von Zellen auf einer Matrix wird ermöglicht durch Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, sowohl durch kontinuierliche Neubildung und Kontraktion von Aktin-Filamenten, als auch durch permanente Neubildung und Entfernung von Fokalkontakten der Zelle auf der Matrix. Eine propulsive Ausgestaltung von Filopodien, Lamellipodien, usw. als sich in Migrationsrichtung voranschiebende Zellfortsätze, basiert auf Nukleation und Polymerisation von Aktin-Filamenten, sowie Bündelung solcher Filamente zu Fasern. Um die geschilderten Prozesse umzusetzen, bedarf es der enzymatischen Katalyse durch Aktin-Nukleatoren wie dem Arp2/3-Komplex, der während seines Grundzustandes zwar inaktiv ist (Welch et al., 1998), sich jedoch von Proteinen der WASP/Scar-Familie, die innerhalb einer Kaskadenreaktion wiederum selbst u.a. der Aktivierung durch Rho-GTPasen unterliegen, signifikant aktivieren lässt (Miki und Takenawa 1998; Takenawa und Miki 2001; Machesky und Gould 1999; Rohatgi et al. 1999).

Nicht nur das lineare Wachstum des F-Aktins und seine Neu-Nukleation spielen in diesem Zusammenhang eine grundlegend wichtige Rolle, sondern auch die „laterale“ Nukleation an bereits existierenden Filamenten trägt dazu bei, den propulsiven Charakter der Zelle zu verstärken. Indem der Arp2/3-Komplex von der Seite an F-Aktin bindet, wird ein Verzweigen (*Branching*) der Filamente in einem Winkel von 70° initiiert (*Dendritic Nucleation Model*; Blanchoin et al., 2000a) und es findet eine weitere Aktivierung des Moleküls statt (Higgs and Pollard, 1999; Pantaloni et al., 2000). Damit einhergehend, dass der Arp2/3-Komplex am *Leitsaum* der migrierenden

Zelle lokalisiert ist (Machesky et al., 1997), zeigt sich in vivo die Gestaltung eines komplexen Aktin-Netzwerkes, welches eine erhebliche mechanische Stabilität besitzt (Amann und Pollard 2001), die bei der Ausbildung von Pseudopodien als propulsive Kraft zum tragen kommt (Machesky et al., 1997). (Abbildung 1.3a).



**Abbildung 1.3a:** Darstellung der dendritischen Aktin-Nukleation bzw. Bildung von Aktin-Filamenten am *Leitsaum* migrierender Zellen. Profilin (schwarz); nicht-polymerisiertes ATP-Aktin (hellblau); WASP-/WAVE-/SCAR-Proteine (grün); Arp2/3-Komplex (rot); Capping-Proteine (gelb); ADF/Cofilin (grau); ADP-Aktin (dunkelblau). (Aus: Pollard et al., 2001, modifiziert).

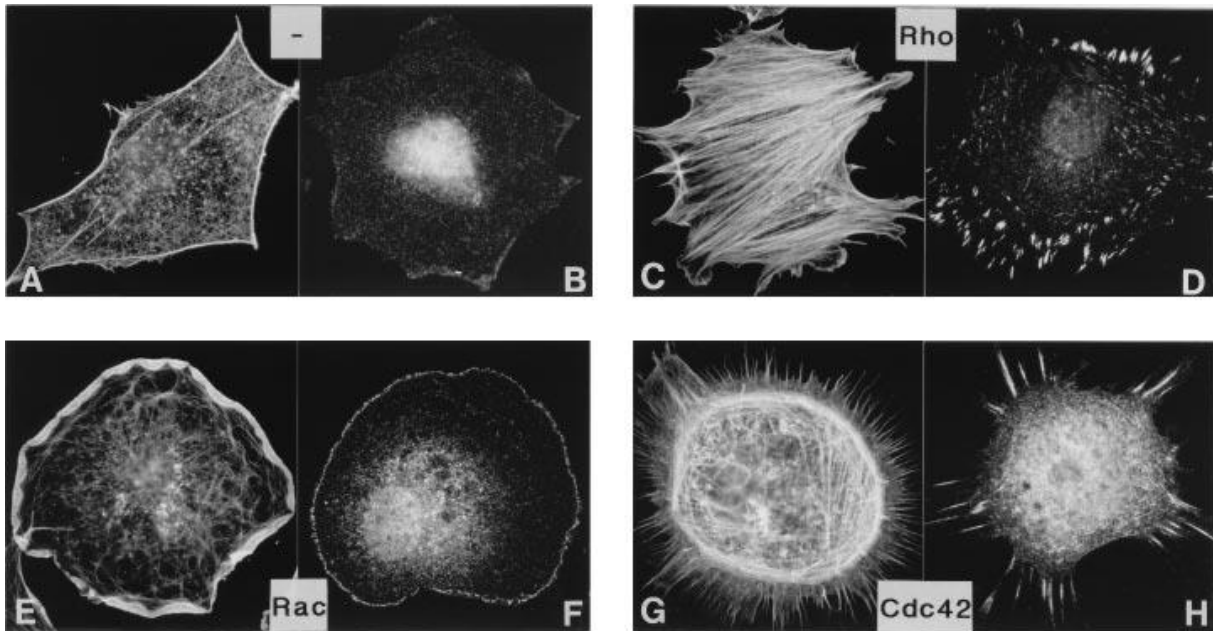
## 1.4 Kleine Rho-GTPasen

### 1.4.1 Bedeutung der kleinen Rho-GTPasen für die Zelle

Kleine Rho-GTPasen sind Proteine von 20-30 *kDa* und zählen zur Ras-Superfamilie. In Säugern kennt man über 10 verschiedene kleine Rho-GTPasen, darunter einige in unterschiedlichen Isoformen (Bishop und Hall, 2000; Übersicht bei Etienne-Manneville und Hall, 2003). Als zentrale Regulatoren wichtiger Signaltransduktionskaskaden beeinflussen Rho-GTPasen maßgeblich u.a. *membrane traffic*, Migration, Adhäsion, Zellzyklus, Transkription und schließlich die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts (Hall, 1998; Van Aelst und D'Souza-Shorey, 1997; Bishop und Hall, 2000). RhoA/B, Rac1 und Cdc42 sind die am besten untersuchten GTPasen der Rho-Familie (Ridley, 2001).

Unter Verwendung verschiedener Mutanten der jeweiligen Proteine mit unterschiedlicher Aktivität bzw. Affinität zu GTP ist es möglich, den Einfluss der genannten Rho-GTPasen auf das Aktin-Zytoskelett genau zu untersuchen (Hall, 1998; Feig, 1999; Übersicht bei Ridley, 2001). Auf diese Weise konnte bewiesen werden, dass RhoA in die Regulation von Stressfasern und fokalen Adhäsionen involviert ist (Ridley und Hall, 1992), Rac1 einen modulierenden Einfluss auf *membrane ruffling* besitzt (Ridley et al., 1992) und Cdc42 die Ausbildung von Filopodien reguliert (Kozma et al., 1995; Nobes und Hall, 1995) (Abbildung 1.4a).

Analoge Effekte erzielte man durch Einsatz diverser bakterieller Toxine, die eine kovalente Modifikation der kleinen Rho-GTPasen bewirken und sie so aktivieren oder inaktivieren (Übersicht bei Aktories, 1997; Lerm, 2000; Übersicht bei Boquet und Lemichez, 2003). Studien der vergangenen Jahre indizierten eine regulatorische Funktion der RhoGTPasen bei endozytotischen und phagozytotischen Vorgängen (Übersicht bei Ridley, 2001; Übersicht bei Qualmann und Mellor, 2003; Symons und Rusk, 2003).



**Abbildung 1.4a:** Einfluss von Rho, Rac und Cdc42 auf die Aktin-Organisation dargestellt am Beispiel von Swiss 3T3 Fibroblasten. Die Aktinfilamente wurden mit Rhodamin-Phalloidin, die Fokalkontakte mit einem Vinculin-Antikörper lokalisiert. Serum-ausgehungerte Fibroblasten bilden nur sehr wenige Aktinfilamente (A) und Fokalkontakte (B). Ausbildung von vielen deutlich erkennbaren Stressfasern (C), sowie zahlreichen Fokalkontakten (D) nach Mikroinjektion von konstitutiv aktiviertem Rho. Eine entsprechende Behandlung mit Rac führt zur Entstehung eines ausgeprägten Lamellipodiums (E) und damit verbundene Adhäsionspunkte (F). Aus einer Aktivierung der kleinen Rho-GTPase Cdc42 resultiert eine massive Bildung von Filopodien (G) und Fokalkontakten (H). (Aus: Hall, A. (1998) Science 279, 509-514.)

#### 1.4.2 Rho-GTPasen und *membrane traffic*

Sowohl die initiale Aufnahme von Partikeln als auch eine Reihe von endozytotischen Schritten werden von Proteinen der Rho-Familie, insbesondere RhoA, Rac1 und Cdc42, aber auch von den weniger bekannten Rho-GTPasen RhoB (Robertson et al., 1995) und TC10 (Murphy et al., 1996; Murphy et al., 2001) beeinflusst.

Cdc42 reguliert in Epithelzellen die polarisierte Endo- und Exozytose an deren basolateralen Membran (Kroschewski et al., 1999), die Exozytose in Mastzellen (Brown et al., 1998; Hong-Geller und Cerione, 2000) und konnte zudem in einer Interaktion mit der  $\gamma$ -Untereinheit des *Coatamer*-Komplexes am Golgi-Apparat lokalisiert werden (Erickson et al., 1996).

Gemeinsam regulieren Cdc42 und Rac1 die FcR-vermittelte Endozytose (Massol et al., 1998; Bagrodia und Cerione, 1999; Botelho et al., 2000; May und Machesky, 2001; Diakonova et al., 2002), die Makropinozytose der aus dem Knochenmark

stammenden dendritischen Zellen (Garrett et al., 2000) und die Phagozytose apoptotischer Zellen (Albert et al., 2000; Leverrier und Ridley 2001).

Rac1 steuert die Makropinozytose dendritischer Zellen (Nobes und Marsh, 2000) und reguliert allen Anzeichen nach die Freisetzung von Neurotransmittern aus Vesikeln, an denen das Protein in assoziierter Form lokalisiert werden konnte (Doussau et al., 2000). Gemeinsam beeinflussen Rac1 und RhoA die zelluläre Transferrin-Internalisierung (Lamaze et al., 1996) und, durch ihre erhöhte Konzentration an den Caveolae bedingt, die Polarisierung der Zelle bzw. die Umstrukturierung des Zytoskeletts (Senda et al., 1997; Michaely et al., 1999; Kawamura et al., 2003). RhoA reguliert die bereits in Kapitel 1.2.3.3 geschilderte Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose (Allen und Aderem, 1996; Caron und Hall, 1998; May et al., 2000).

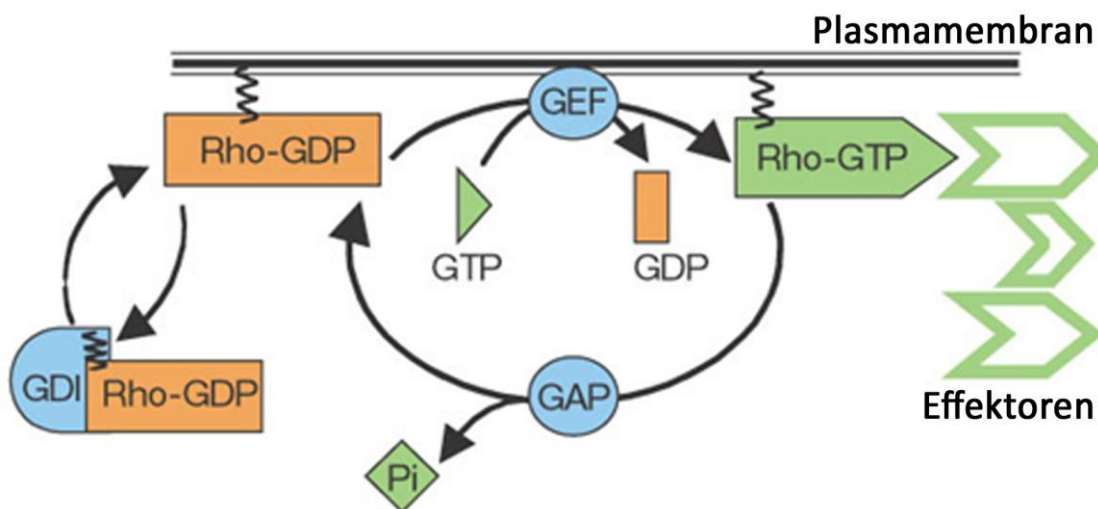
RhoB hingegen ist lokalisierbar an späten Endosomen (Adamson et al., 1992), perinukleären Golgi-Vesikeln (Michaelson et al., 2001) und am sogenannten *multivesicular body*, einem prälysosomalen Kompartiment (Robertson et al., 1995).

Tc10 ist eine GTPase, die an der Plasmamembran und an lamp-1-positiven späten Endosomen vorkommt und Ähnlichkeit zu Cdc42 aufweist (Michaelson et al., 2001). Desweiteren bestimmt Tc10 die Glucose-Aufnahme über GLUT4-Transporter (Chiang et al., 2001).

Untersuchungen mit NPs unterschiedlicher Form, aber gleicher Volumina, zeigen ein voneinander abweichendes zelluläres Internalisierungsvermögen. Untersucht wurden weiterhin die damit zusammenhängenden endozytotischen Signalwege auf molekularer Ebene (Meng et al., 2011). Dabei ist die Aktivierung der *kleinen GTPasen* (z.B. Rac1 und Cdc42) mit der daraus folgenden Formationen der Filopodien auf die Anwesenheit von NPs als externe Stimuli zurückzuführen. Externe nanoskalige Stimuli sind dazu befähigt, Membran-assoziierte Signalkaskaden zu aktivieren, die für die Aktin-Polymerisation und Veränderungen der Plasmamembran verantwortlich sind (Mercer und Helenius, 2009).

### 1.4.3 Regulatoren der Rho-GTPasen

Um als *molekulare Schalter* fungieren zu können, alternieren die Rho-GTPasen zwischen einem inaktivierten, GDP-gebundenen und einem aktivierten, GTP-gebundenen Zustand. Es sind drei Gruppen regulatorischer Proteine bekannt, die modulierend auf diesen Zyklus einwirken (Boguski und McCormick, 1993) und in Abbildung 1.4.3a als Übersicht dargestellt sind.



**Abbildung 1.4.3a:** Der GTPase Zyklus kleiner Rho GTPasen am Beispiel Rho. GEF = Guanin Nukleotid Austausch Faktoren (engl. *Guanine nucleotide exchange factors*); GAP = GTPase aktivierende Proteine (engl. *GTPase-activating proteins*); GDI = Guanin Nukleotid Austausch-/Dissoziations-Inhibitoren (engl. *Guanine nucleotide exchange/dissociation inhibitors*); (GDP = Guanosindiphosphat, GTP = Guanosintriphosphat (Aus: Etienne-Manneville und Hall, 2002, modifiziert).

Um die im inaktiven Zustand zytosolisch vorliegenden Rho-GTPasen in die Lage zu versetzen, mit Membranen zu interagieren, bedarf es einer posttranslationalen Modifikation durch Prenylierung eines Cystein-Restes am C-Terminus (Casey et al., 1989; Machesky and Hall, 1996; Laufs und Liao, 1998), zumal der Membrankontakt für die Aktivität dieser Rho-Proteine unabdingbar ist (Willumsen et al., 1984; Casey et al., 1991; Bokoch et al., 1994).

Während die Rho-GTPasen in Form eines löslichen Komplexes mit GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) inaktiv vorliegen, sind sie im Zytosol lokalisierbar (Olofsson, 1999). Zurückzuführen ist dieser stabilisierte GDP-gebundene Zustand auf die Eigenschaft der GDIs, am für die Verankerung in der Membran verantwortlichen,

prenylierten C-Terminus der GTPasen zu binden (Hancock und Hall, 1993; Bishop und Hall, 2000).

GDFs (*GDI dissociation factors*) katalysieren die Dissoziation des GTPase-GDI-Komplexes und ermöglichen so den überwiegend an Membranen lokalisierten GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) den Austausch von GDP gegen GTP zu katalysieren (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Kaibuchi et al., 1999; Kjoller und Hall 1999; Zheng, 2001). Im daraus folgenden aktivierten Zustand interagieren die Rho-Proteine mit einer Vielzahl von Effektorproteinen (Kaibuchi et al., 1999), wobei sie a priori deren Aktivität regulieren (Aspenström, 1999). GAPs (*GTPase activating proteins*) stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität, bzw. die Hydrolyse des gebundenen GTP und damit auch die Inaktivierung der GTPase, die somit erneut ein entsprechendes GDI-Substrat darstellt und als solcher Komplex ins Zytoplasma zurückkehrt (Isomura et al., 1991; Hori et al., 1991; Adamson et al., 1992; Bokoch et al., 1994; Lamarche und Hall 1994).



## 1.5 Das Tubulin-Zytoskelett

Mikrotubuli (MT) spielen vor allem eine essentielle Rolle bei der dynamischen Gestaltung der Zellstruktur, der Karyokinese und der Positionierung einzelner Zellorganellen. Sie dienen aber auch, ähnlich wie ein intrazelluläres Schienensystem, als Transportwege für Vesikel, etc. (Gregoretta et al 2006; Verhey und Gaertig, 2007). Aufgebaut sind die MT aus Tubulin, einem stabilen Dimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin als Untereinheiten. Aneinandergelagert ergeben die Tubulinmoleküle kettenartige Protofilamente. Jeweils 13 dieser Protofilamente bilden eine Röhre mit 18 bis 25 nm Durchmesser. MT besitzen eine Polarität, bedingt durch das schneller wachsende Plusende und das langsamer wachsende Minusende (Abbildung 1.5a). In der Regel weist das schnell wachsende Plusende in Richtung Zellperipherie, während das Minusende am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum MTOC (*Microtubule-organizing-center*) stabilisiert ist (Wilson und Jordan, 1995; Desai und Mitchison, 1997; Howard und Hyman, 2007).

Am meist aus einem Paar zylindrischer Zentriolen zusammengesetzten MTOC erfolgt die hauptsächliche MT-Nukleation. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Anwesenheit von  $\gamma$ -Tubulin. Diese besondere Tubulin-Isoform bildet mit weiteren Proteinen einen großen ringförmigen Proteinkomplex, den sogenannten „ $\gamma$ -Tubulin-Ring-Komplex“, der die Polymerisation von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin bewirkt und somit die MT-Bildung einleitet (Heald und Nogales, 2002).

Die entstehenden MT sind keine statischen Strukturen, sondern unterliegen einer permanenten Polymerisation und Depolymerisation. Den hierbei ständigen Wechsel aus Wachstum und Schrumpfung nennt man *Dynamische Instabilität* (Abbildung 1.5a), welche von grundlegender Signifikanz ist für die intrazelluläre räumliche Anordnung der MT und der damit einhergehenden Transportfunktion entlang der MT-Filamente (Mitchison und Kirschner, 1984; Holy und Leibler, 1994).

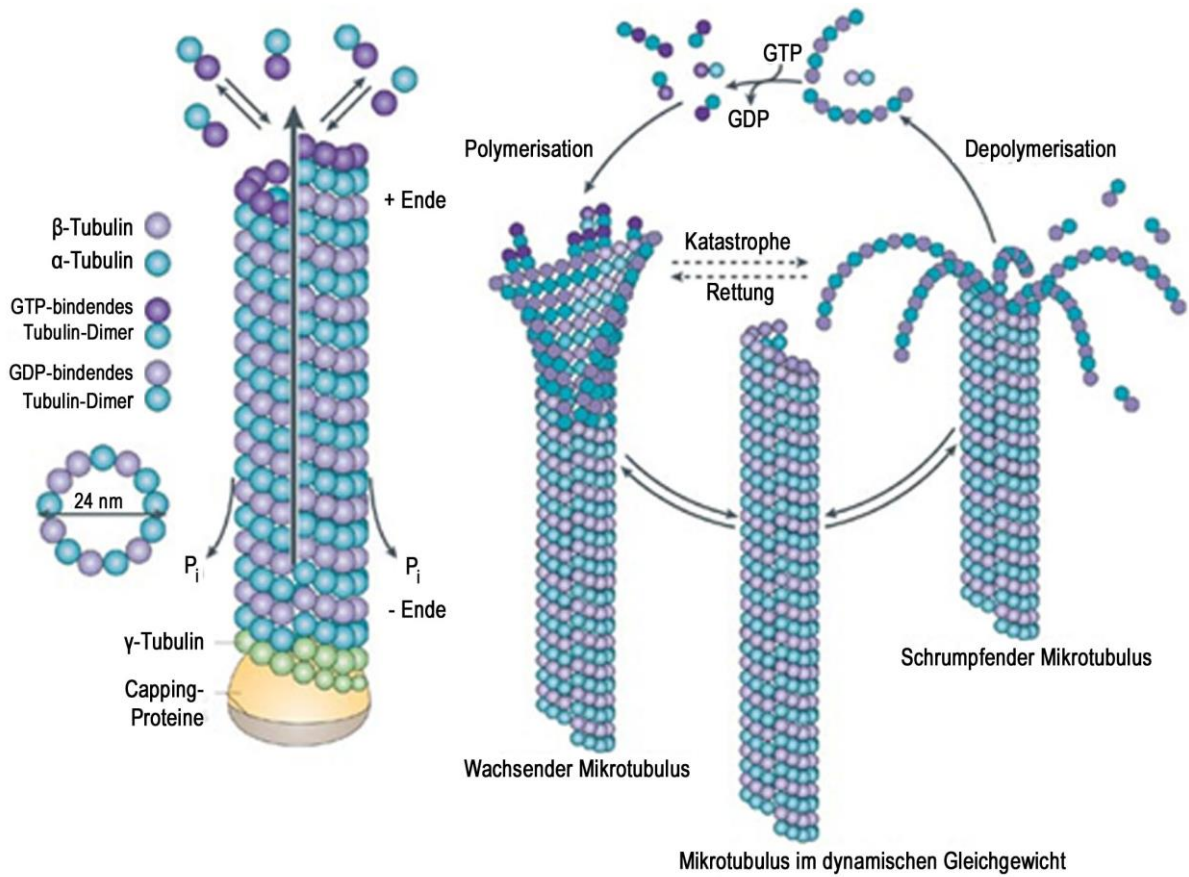
Zu Beginn der sukzessiven MT-Bildung assoziieren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin der Länge nach zu kurzen Protofilamenten, worauf diese untereinander zur Stabilisierung eine Faltblattstruktur ausbilden, bis schließlich solch ein Konstrukt aus 13 Protofilamenten einen Mikrotubulus bildet. Das darauf stattfindende Wachstum erfolgt durch

Anlagerung weiterer Untereinheiten an die Enden der jeweiligen Protofilamente. Jede der Untereinheiten vermag Guanosin-Nukleotide zu binden, jedoch bindet Guanosintriphosphat (GTP) ausschließlich an die  $\beta$ -Isoform und erfährt dort eine Hydrolyse zu Guanosindiphosphat (GDP) während der Tubulinpolymerisierung (Heald und Nogales, 2002). Übertrifft die Rate der GTP-Hydrolyse die Rate der Polymerisation, so bildet sich am Plusende eine GTP-Kappe, obwohl die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten überwiegend GDP enthalten. Geht diese Kappe beispielsweise durch Hydrolyse verloren, findet eine spontane Depolymerisation (*Katastrophe*) statt (Abbildung 1.5a; Gregorette et al., 2006; Verhey und Gaertig, 2007).

Stabilität und Dynamik der MT werden von speziellen akzessorischen Proteinen (*microtubule-associated proteins*, MAPs) beeinflusst und gesteuert, indem sie Tubulindimere binden, Polymere stabilisieren bzw. destabilisieren oder an MT-Enden binden. MAP2 und Tau sind klassische Vertreter der MAPs und verbinden mehrere Untereinheiten, indem sie sich an die MT-Oberfläche anlagern. Andere MAPs, wie die +TIPS (Plus-end tracking proteins) mit ihren typischen Vertretern CLIP-170 (*Cytoplasmic linker protein*) und EB1 (*End-binding*), binden an die MT-Plusenden und können dort mit neuen Tubulin-Untereinheiten polymerisieren bzw. konformationsspezifische Bindungen an MT-Enden eingehen. Katanin hingegen ist ein Protein, welches MT schneidet. Die daraus resultierenden Enden besitzen keine GTP-Kappe und können daher depolymerisieren. Op18/Stathmin entzieht dem dynamischen Gleichgewicht Tubulindimere und erhöht somit die dynamische Instabilität (Heald und Nogales, 2002; Verhey und Gaertig, 2007).

In Studien konnte gezeigt werden, dass  $\text{TiO}_2$  und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs mit MT bzw. Tubulin interagieren, indem sie MT zerstören und die Tubulin-Polymerisation inhibieren. Durch Beeinflussung der Proteinfaltung und GTP-bindenden Seite wird schließlich auch die Funktionalität der MT beeinträchtigt. NPs können also in Zellen eindringen und angereichert werden, wo sie dann schließlich mit den im Zytoplasma vorkommenden Proteinen interagieren (Naghi et al., 2008; Khaleghian et al 2010). Permeationsuntersuchungen mit Caco-2 Zellen zeigten verschiedene Transportmechanismen von Gold NPs (5 nm Durchmesser) mit unterschiedlicher Polymerbeschichtung in die Zellen, bzw. durch den Zellmonolayer hindurch. Neben parazellulärer Permeation konnten auch endozytotische Aufnahmeprozesse

nachgewiesen werden bei denen Polyethylenglycol-beschichtete Gold NPs unter Beteiligung von MT endozytiert wurden (Lin et al., 2012).



**Abbildung 1.5a:** Schematischer Aufbau und dynamische Instabilität von Mikrotubuli (aus Conde und Cáceres, 2009, modifiziert).

## 1.6 NF- $\kappa$ B

Seit seiner Entdeckung im Jahre 1986 wurde der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) zunehmend Gegenstand einer immer breiter werdenden Palette an wissenschaftlichen Studien. Die bis dato gewonnenen Erkenntnisse über die jeweilige Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen, Immunantwort, Tumorentstehung, usw. gehen konform mit der Komplexität der entsprechenden Signalwege. Beim nahezu ubiquitär vorkommenden NF- $\kappa$ B handelt es sich nicht um ein einzelnes Protein, sondern um die Mitglieder der sogenannten NF- $\kappa$ B/Rel-Familie. In Säugetierzellen sind das die fünf Proteine RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50; p105) und NF- $\kappa$ B2 (p52; p100), die während des inaktivierten Zustands im Zytoplasma lokalisiert sind. Auf der jeweils ca. 300 Aminosäuren umfassenden sogenannten *Rel-Homologie-Domäne* sind gemeinsame Eigenschaften konserviert, wie die Fähigkeit untereinander in unterschiedlichen Kombinationen Dimere zu bilden, das Lokalisieren im Nukleus, sowie das Besitzen der charakteristischen DNA-Bindungsdomäne (Sen und Baltimore, 1986; Li und Verma, 2002; Nishikori et al., 2005; Fazal et al., 2007).

Obwohl in einigen Zelltypen (z.B. B-Lymphozyten) NF- $\kappa$ B konstitutiv im Zellkern lokalisiert ist, findet man das Protein in der Regel im Zytoplasma, bis durch proteolytische Prozesse die C-terminalen inhibitorischen Domänen entfernt werden und die daraus resultierenden Proteine in den Nukleus eindringen können. Die inhibitorisch wirkenden Regulatoren dieses Prozesses gehören zur Familie der I $\kappa$ B-Proteine (I $\kappa$ B; Li und Verma, 2002; Hayden und Ghosh, 2004; Nishikori et al., 2005).

## 1.7 NP-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B über ROS

In zahlreichen Studien wurde belegt, dass nanoskalige Partikel unterschiedlicher Art oxidativen Stress durch gesteigerte Generierung von ROS erzeugen (Donaldson et al. 2005; Nel et al. 2006). Der Begriff „ROS“ beinhaltet eine Reihe von Molekülen deren Entstehung auf Elektronen- bzw. Energie-Transfer basiert, welcher in der Aktivierung von Sauerstoff in Form von beispielsweise Superoxid-Radikalen, Singulett-Sauerstoff, usw. mündet (Unfried et al 2007). Sun et al. zeigen in einer jüngeren Studie am Beispiel der häufig verwendeten amorphen Silika NPs deren Potential, Mitochondrien zu schädigen und die zelluläre Produktion an ROS zu erhöhen (Sun et al., 2011). Liu und Sun gelang es in humanen Endothelzellen neben der von Silika NPs induzierten Mitochondriendepolarisation und ROS-Produktion die dadurch ausgelöste Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachzuweisen (Liu und Sun, 2010).

Die aktivierte NADPH-Oxidase setzt Sauerstoff unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator zu Superoxid-Anionen um. NADPH wird durch Abbau von Glukose über den Hexose-Monophosphat-Weg bereitgestellt (Kaufmann, 2009). Aktiviert wird die NADPH-Oxidase unter anderem durch Rac (Park, 2003). Die NADPH-Oxidase und Rac1 vermitteln die Generierung von Superoxiden (Fürst et al., 2005), wobei die Rac-vermittelte Produktion von ROS zu einer Herabsetzung der Rho-Aktivität führt (Park, 2003).

Oxidativer Stress aktiviert intrazelluläre Signaltransduktionswege, an deren Endpunkte die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine bzw. eine veränderte Zell-Proliferation und Apoptose stehen (Albrecht et al. 2004; Unfried et al. 2007). Redox-regulierte Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und Aktivatorprotein-1 (AP-1) spielen eine Rolle für partikelinduzierte zelluläre Antworten, da deren Aktivierung eine Veränderung der Proliferations- und Apoptose-Rate herbeiführen kann. Zudem beeinflussen sie die transkriptionelle Regulation von Zytokinen, wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 8 (IL-8), Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), aber auch Wachstumsfaktoren, wie den Transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ ) (Albrecht et al 2004).

Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, zu denen man den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGF-R) zählt, sind in der Lage, Signalkaskaden zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu steuern. Gerade bei partikelinduzierten Signaltransduktionen spielen sie eine wichtige Rolle, denn neben EGF und anderen Liganden, führt auch oxidativer Stress zu ihrer Aktivierung (Abdelmohsen et al. 2003; Fickova 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass die genannten „Akteure“ der an der ROS-Produktion beteiligten Signaltransduktionen u.a. von der regulatorischen Funktion der Rho-GTPasen abhängig sind und somit in unmittelbarer Wechselwirkung zueinander stehen (Gregg et al. 2004).

## **2. Material und Methoden**

## 2.1 Zell-Isolation und Zellkultur

### 2.1.1 Enzymlösungen

#### DNase-Lösung

DNase, Cat.No. D5025, Sigma                      10.000 U/ml

#### Trypsin-Lösung

Trypsin Typ1, Cat.No. T8003, Sigma              100 mg/ml

#### Elastase-Lösung

Elastase Cat.No. LS002279, Worthington      0,641 mg/300 µl-Aliquot

Als Lösemittel für die angegebenen Enzymlösungen diente BSSB. Nach dem Aliquotieren wurden die Lösungen bei -20° C gelagert.



### 2.1.2 Pufferlösungen

#### PBS (phosphate buffered saline)

KCl		0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,20 g
NaCl		8,00 g
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad	1000 ml

Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte durch Zugabe von 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH. Im Anschluss wurde die Lösung bei 123° C und 3 bar für 15 min autoklaviert.

#### BSSB (Balanced Salt Solution B)

NaCl		8,00 g
KCl		0,40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		0,14 g
HEPES		2,38 g
Glucose		1,00 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		0,29 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		0,27 g
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad	1000 ml

Nach Einstellung des pH-Werts auf 7,4 wurden Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde durch Bottle Top Filter mit der Porengröße 0,2 µm in autoklavierte Flaschen sterilfiltriert.

### Inhibitionsbuffer

DMEM/F12, PAA, Pasching, Austria	30,0 ml
DNase-Lösung	1,0 ml
FCS	10,0 ml

### Adhäsionspuffer

DMEM/F12	22,5 ml
DNase-Lösung	1,0 ml
SAGM, Cambrex, East Rutherford, NJ, USA	22,5 ml

Die Lösungen wurden jeweils kurz vor Gebrauch frisch angesetzt.

### **2.1.3 Nährmedien**

Alle verwendeten Medien und Zusätze wurden als endotoxinfrei gekennzeichnet bezogen, um einer Vorstimulation der Makrophagen sowie einer Toleranzentwicklung nach Dauerexposition von LPS vorzubeugen (Boyte et al., 1996; Hoppstädter et al., 2010).

Zur Kultivierung der Makrophagen wurde das chemisch definierte Zellkulturmedium RPMI 1640 (PAA, Pasching, Austria) verwendet, welches durch einen Zusatz von 5 % (bei THP-1 10 %) FCS (Fetal Calf Serum) Gold (PAA Pasching, Austria) und L-Glutamin in einer Endkonzentration von 2 mM ergänzt wurde. Zudem bediente man sich während der Makrophagen-Isolation weiterer Nährmedien, wie DMEM/F12 (PAA, Pasching, Austria) und SAGM (Cambrex, unter Zusatz von 5 % FCS). Da bei der Gewinnung von Primärkulturen kein vollständig steriles Arbeiten gewährleistet ist, wurde den Medien stets eine Antibiotika-Kombination in Form von Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml, PAA, Pasching, Austria) zugesetzt (Hoppstädter, 2010).

### 2.1.4 Bestimmung der Zellzahl durch Trypanblau-Vitalfärbung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Das Deckglas des Hämocytometers wurde dabei mit mäßigem Druck auf der Oberseite der Zählkammer aufgelegt und durch Adhäsionskräfte fixiert. Der für die Auszählung der Zellen relevante Bereich wird durch eines der neun Großquadrate dargestellt. Bei einer Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  des Quadrats und einem Abstand zum Deckgläschen von  $0,1 \text{ mm}$  ergibt sich ein Volumen von  $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ .

Die zur Zellzahlermittlung bestimmte Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 in einer 0,2 %-igen Trypanblau (Sigma)/ PBS-Mischung verdünnt. Nachdem diese verdünnte Suspension in die Zählkammer appliziert wurde, konnten die Zellen innerhalb eines Großquadrats (bestehend aus 16 Kleinquadraten) gezählt werden und somit die Lebendzellzahl  $L$  [Zellen/ml] wie folgt berechnet werden:

$$L = Z \times 10 \times 10^4$$

$Z$  = Anzahl der lebenden (ungefärbten) Zellen innerhalb eines Großquadrats

Die angegebenen Zellkonzentrationen richten sich nach dem Mittelwert der ausgezählten vier Eckquadrate (Nexcelom Bioscience).

### 2.1.5 Isolation der Makrophagen

Das für die Isolierung benötigte menschliche Lungengewebe wurde mit Genehmigung der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes (Ethik-Antrag-Nr. 130/08, „Untersuchung molekularer Mechanismen der Aktivierung humaner Lungenmakrophagen“) von den SHG Kliniken Völklingen bezogen. Die Notwendigkeit zur operativen Entfernung des Gewebes basierte meist auf entsprechender Tumorerkrankung der Patienten. Explizit das vom Tumor nicht befallene (periphere) Lungenparenchym diente zur Zellisolation und wurde direkt nach Resektion unter Kühlung *via* Taxi zur Universität des Saarlandes transportiert. Anschließend wurden neben Epithelzellen die für diese Arbeit benötigten AMs und IMs anhand eines modifizierten Protokolls nach Elbert et al. (1999) isoliert.

#### 2.1.5.1 AM-Isolation

Das in Medium gelieferte Lungengewebe wurde in Zellkulturschalen ( $\varnothing$  100 mm) überführt und mit Skalpell in ca. 1 cm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten; Bronchien waren (falls vorhanden) zu entfernen. Die Gewebestücke wurden mehrfach mit PBS- bzw. BSSB gespült und zur Isolation von IMs und Epithelzellen weiterverwendet. Waschpuffer und Medium des Ausgangsmaterials wurden vereinigt (in mehrere 50 ml Zentrifugenröhrchen) und zur AM-Isolation verwendet, indem als erstes 15 min bei 350 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen. Die erhaltenen Pellets wurden zur Lyse der Erythrozyten mit jeweils 5 ml sterilem bidestilliertem Wasser versetzt und nach ca. 20 Sekunden mit jeweils 45 ml PBS ergänzt. Es wurde erneut 15 Minuten bei 350 g zentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Bei Bedarf wurde der Vorgang der Erythrozytenlyse wiederholt. Eine vollständige Entfernung der Erythrozyten gelang im Allgemeinen nicht. Die erhaltenen Pellets wurden in Kulturmedium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl in einer Dichte von  $8 \times 10^6$  Zellen pro Zellkulturschale ( $\varnothing$  100 mm) ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die mittlerweile adhärenierten Zellen mit PBS gewaschen und die verbliebenen Erythrozyten beseitigt. Der Erfolg der Waschschrirte wurde mikroskopisch kontrolliert (Elbert et al., 1999; Hoppstädter, 2010).

### 2.1.5.2 IM-Isolation

Die IM-Isolation wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Lehr (Biopharmazie und Technologie, UdS) durchgeführt.

Das in kleine Stücke geschnittene Lungengewebe wurde zerhackt (McIlwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Co LTD). Das zerhackte Gewebe wurde im Anschluß in ein Zentrifugenröhrchen mit 30 ml angewärmten BSSB-Puffer überführt und über ein Zellsieb mit Porengröße 100 µm gefiltert. In jeweils frische Pufferlösung aufgenommen wurde der Waschschrift so lange wiederholt, bis das Filtrat klar blieb. Danach wurde das Gewebe in DMEM/F12 eingebracht und über Nacht bei 4° C gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte die Filtration des Gewebes mit BSSB über ein Zellsieb (100 µm) bis das Medium ausgewaschen und das Filtrat klar waren. Danach fand der Verdau mit Elastase und Trypsin statt. Dazu wurde das Gewebe in einen Erlenmeyerkolben mit 30 ml angewärmten BSSB, 1500 µl Trypsin-Lösung und 300 µl Elastase-Lösung gegeben und unter Schütteln 40 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 ml Inhibitionsbuffer.

Nach Resuspendieren wurde das verdaute Gewebe in Form der entstandenen Suspension über einen Gaze-Filter in ein autoklaviertes Becherglas filtriert. Der Rückstand wurde verworfen und das Filtrat wurde durch ein Zellsieb mit der Porengröße 40 µm in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert und 5 min bei 1350 *rpm* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets wurden in insgesamt 45 ml Adhäsionspuffer resuspendiert und die erhaltene Suspension vereinigt. Anschließend erfolgte eine gleichmäßige Aufteilung der Zellsuspension auf drei 100 mm Petrischalen.

Nach 90 min Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Überstand abgenommen und zur Isolation von Epithelzellen in der AG Lehr weiterverarbeitet.

Die adhärennten IMs wurden mehrmals mit PBS gewaschen, bis keine Verunreinigung mehr durch Erythrozyten und andere nicht adhärennte Zellen im Mikroskop sichtbar waren. Anschließend wurden die Zellen bis zur Verwendung in Medium bei 37° C inkubiert.

### **2.1.5.3 Trypsinierung**

Falls eine bestimmte Aussaatdichte gewünscht wurde, wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Cat.No. L11004, PAA) bei 37° C abgelöst. Das Trypsin wurde nach dem Aussäen durch Zusatz von RPMI 1640 mit 20 % FCS inaktiviert und die Zellen 10 min bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt, wonach dann die Aussaat erfolgte (Hoppstädter, 2010).

### **2.1.6 Kulturbedingungen**

AMs und IMs wurden bis zu ihrer Verwendung ein bis drei Tage nach Isolation als adhärennte Monolayer in 6- bis 24-well-Platten oder Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm kultiviert. Bei Bedarf wurden die Makrophagen mit PBS gewaschen; ggf. wurde auch das Medium gewechselt. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank der Firma Thermo Electron bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>.

## **2.1.7 Zelllinien**

### **2.1.7.1 THP-1 – Human acute monocytic leukemia cell line**

THP-1 ist eine humane monozytäre Leukämiezelllinie, abstammend von einem Jungen mit akuter myeloider Leukämie.

#### **2.1.7.1.1 Einfrieren von THP-1**

Eine relativ dichte Zellsuspension (ca. 800.000 Zellen/ml) einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurde 4 min. bei 1000 *rpm* zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 6 ml einer Mischung aus Vollmedium/10 % DMSO resuspendiert und als Suspension in sechs Kryogefäße abgefüllt, welche dann in einer mit 2-Propanol gefüllten Kryo-Box zunächst für max. eine Woche bei -80° C, anschließend bei -196° C in flüssigem Stickstoff eingelagert wurden.

#### **2.1.7.1.2 Auftauen von THP-1**

Kryogefäß mit ca. 1 ml THP-1 in Medium/10 % DMSO kurz bei 37° C im Wasserbad aufgetaut und zügig in eine Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) mit 20 ml Medium überführt.

## **2.1.8 Test auf Mykoplasmen**

Um den Test der Zellkultur auf Mykoplasmenkontamination durchzuführen, wurde der Venor<sup>®</sup>GeM-Mykoplasmen-Detektionskit (#11-1025, Minerva Biolabs, Berlin) verwendet. Dieser Nukleinsäure-Amplifikationstest *via* PCR macht es möglich Mykoplasmen-DNA bis zu einer Grenze von 1 – 5 fg nachzuweisen. Durchgeführt wurde der Test nach Herstellerangaben.

### 2.1.9 Ausdifferenzieren von THP-1

In Abhängigkeit des jeweiligen Versuchs wurde die Zellsuspension mit bestimmter Dichte ausgesät. Die THP-1 wurden mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (Calbiochem) in 100 nM Endkonzentration 48 h bei 37° C im Brutschrank ausdifferenziert.

## 2.2 Bakterienkultur

### 2.2.1 Nährmedium

Kultiviert wurden die Bakterien in Luria-Bertani (LB)-Medium mit Ampicillin 100 µg/ml.

Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 erfolgte mit 0,1 N NaOH bzw. 0,1 N HCl. Anschließend wurde das Medium für 15 min bei 123° C und 3 bar autoklaviert.

Zusammensetzung:	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	D (+) Glucose	1,0 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Nach Abkühlen der autoklavierten Lösung auf ca. 50° C erfolgte die Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml).

### 2.2.2 Eingesetzter Bakterienstamm

Als Wirtsorganismus für die eingesetzten Vektoren wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-Blue (Genotyp: *recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn 10(tet<sup>r</sup>)*], Amsterdam, Niederlande) verwendet.



## 2.3 Nanopartikel-Suspensionen

Alle aufgeführten NP-Suspensionen wurden vom Leibniz Institut für neue Materialien Saarbrücken zur Verfügung gestellt.

### 2.3.1 ZrO<sub>2</sub>-NP in 10%iger Essigsäure

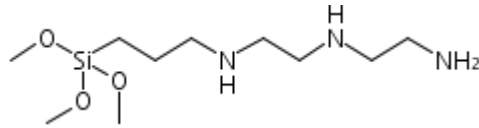
Die in dieser Suspension enthaltenen NPs waren rein sphärische ZrO<sub>2</sub>-Partikel mit einem Durchmesser von 30 nm. Zugrunde liegendes Verfahren für die Herstellung der Partikel war das *Top-Down* Verfahren. Stabilisiert wurde die Formulierung über elektrostatische Effekte zwischen dispergierter Phase und Dispergens. Mit einer ZrO<sub>2</sub>-Konzentration von 40 % (m/V) war dieses heterogene Gemenge als relativ hoch konzentriert anzusehen. Ein pH-Wert von 4,4 wurde durch das saure Dispergens (10%ige Essigsäure) hervorgerufen.

### 2.3.2 TRIAMO-stabilisierte ZrO<sub>2</sub>-Suspension

Anders als bei der unter 2.3.1 aufgeführten Formulierung handelte es sich hierbei um eine elektrosterisch stabilisierte NP-Suspension. Hervorgerufen wurde der stabilisierende Effekt durch kovalent an das ZrO<sub>2</sub> gebundene TRIAMO = 3-[2-(Aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilan (Abbildung 2.3.2a). Nach der NP-Synthese durch *Top-Down* Verfahren erfolgte also eine Oberflächenmodifikation. Der NP-Gehalt der Suspension betrug 27,3 % (m/V) mit einem Anteil von 21,44 % (m/V) ZrO<sub>2</sub>.

Zur Verwendung der Suspension in der Zellkultur musste der pH-Wert der Suspension dem physiologischen pH-Wert von 7,4 angepasst werden. Zudem sollten eine Beeinflussung der Ergebnisse durch evtl. in der Suspension vorkommende Mikroorganismen ausgeschlossen werden, indem die Suspension zuvor autoklaviert wurde. Mittels HCl wurde der gewünschte pH-Wert von 7,4 eingestellt. Hinsichtlich der Stabilität zeigte die Formulierung, dass sie mit einem IEP (isoelektrischen Punkt) bei pH 9,92 über weite pH-Bereiche stabil war. Diese Suspension war ohne

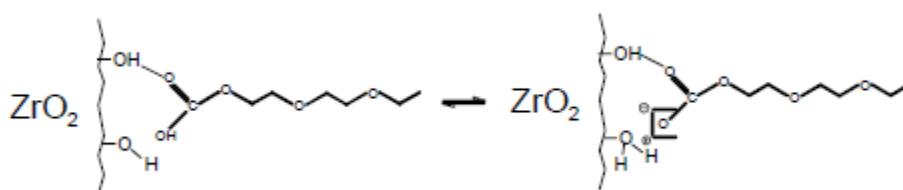
signifikanten Verlust ihrer charakteristischen Eigenschaften autoklavierbar (Kontrolle durch UPA-Messung). Der Durchmesser der hier enthaltenen sphärischen NPs lag bei 50 nm.



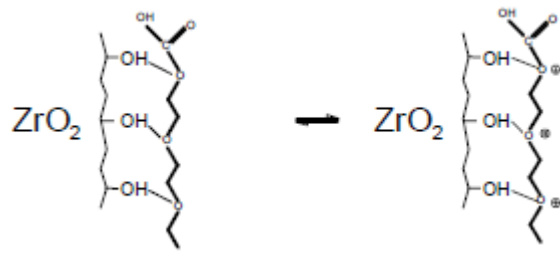
**Abbildung 2.3.2a:** Strukturformel TRIAMO = 3-[2-(Aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilan. Quelle: www.chemexper.com

### 2.3.3 TODS-stabilisierte ZrO<sub>2</sub>-Suspension

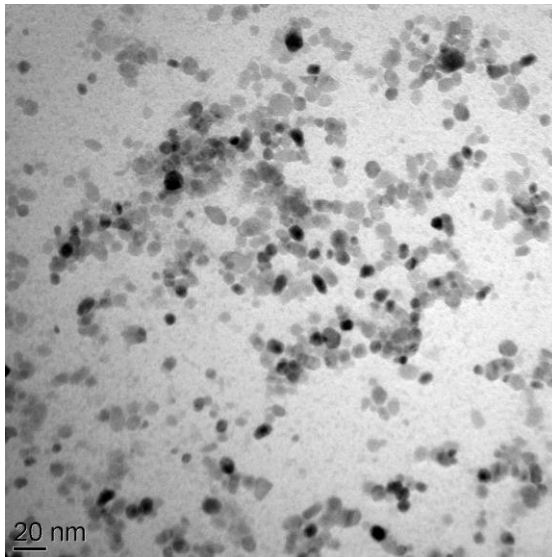
Eine alternative Maßnahme zu Kapitel 2.3.2, die ZrO<sub>2</sub>-NPs elektrosterisch zu stabilisieren ist die kovalente Bindung an TODS = 3,6,9-Trioxadecansäure. Für die Umsetzung dieser Oberflächenmodifikation werden zwei verschiedene Reaktionsmechanismen diskutiert. In der ersten Variante kommt es zur Protonierung der ZrO<sub>2</sub> Pulveroberfläche, worauf sich die Säureanionen der TODS anlagern und somit die Zr-OH Gruppe als protonierte Brönsted-Base ZrOH<sub>2</sub><sup>+</sup> dient (Abbildung 2.3.3a). Variante zwei basiert auf Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit anschließender Reaktion zwischen den an der TODS vorhandenen Oxagruppen und den Protonen an der ZrO<sub>2</sub> Pulveroberfläche unter Bildung von Oxoniumsalzen (Abbildung 2.3.3b). Die Produkte beider Varianten erklären auch die positive Oberflächenladung der Partikel (Knoll, 2001). Zur Verfügung gestellt wurde eine Suspension dieser Art in 40%iger (m/V) Konzentration mit einem pH-Wert von 3 – 3,5 (Abbildung 2.3.3c).



**Abbildung 2.3.3a:** Anbindung der Carboxyl-Gruppe an die protonierte Brönsted-Base ZrOH<sub>2</sub><sup>+</sup> (entnommen aus Knoll, 2001).



**Abbildung 2.3.3b:** Reaktion der Oxagruppen mit der Pulveroberfläche (entnommen aus Knoll, 2001).



**Abbildung 2.3.3c:** TEM-Aufnahme von  $ZrO_2$ /TODS NPs in Wasser, pH-Wert = 3,5 (Quelle: INM Saarbrücken).

## 2.3.4 Fluoreszenzmarkierte NP-Suspensionen auf Silikabasis

### 2.3.4.1 Allgemein

Die Partikelsynthese erfolgte nach der Stöber-Synthese, d.h. ausgehend von der Hydrolysereaktion des Precursors (Tetraethylorthosilicat = TEOS) wurden Kondensationskeime gebildet mit anschließendem Partikelwachstum bis zur gewünschten Größe der sphärischen NPs (Viel, 2008). Der Fluoreszenzfarbstoff wurde bei dieser Synthese in die Partikelmatrix eingebunden. Um dies zu bewerkstelligen wurde der Farbstoff zuvor in Form einer aktivierten Carbonsäure mit einer Aminosilanverbindung zum Carbonsäureamid umgesetzt. Durch das Einbringen des Farbstoffs in die Partikelmatrix, mussten die Partikel nicht ausschließlich an der Oberfläche mit den Fluorophoren markiert werden und ermöglichten so zum Teil eine Beibehaltung des *Silika-Charakters* an der Partikeloberfläche.

Die Partikel lagen in Reinstwasser suspendiert vor und wurden sterilfiltriert (Celluloseacetat-Filter; 0,2  $\mu\text{m}$ ). Die Lagerung der Suspensionen erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 – 8° C.

### 2.3.4.2 PBio.S4

Fluoreszenzfarbstoff: ATTO 590 NHS-ester (ATTO-TEC GmbH, Abbildung 2.3.4.2a)

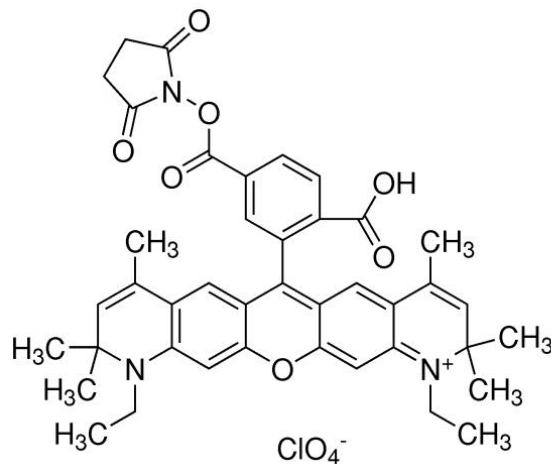
Fluoreszenzdaten:  $\lambda_{\text{Abs}} = 590 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 618 \text{ nm}$

Feststoffgehalt: 0,2 % (m/V)

pH-Wert: 6,7

Zetapotential [mV]: -41,7

d90 = 131,3 nm



**Abbildung 2.3.4.2a:** Atto 590 NHS Ester (ATTO-TEC GmbH). Strukturformel von [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) entnommen.

### 2.3.4.3 PBio.S4.PICS750

Fluoreszenzfarbstoff: ATTO 590 NHS-ester (ATTO-TEC GmbH, Abbildung 2.3.4.2a)

Fluoreszenzdaten:  $\lambda_{\text{Abs}} = 590 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 618 \text{ nm}$

Feststoffgehalt: 0,14 % (m/V)

pH-Wert: 6,6

Zetapotential [mV]: -22,4

d<sub>90</sub> = 128,8 nm

#### Oberflächenmodifikation:

Im Gegensatz zu PBio.S4 wurden die Partikeloberflächen dieser Suspension zusätzlich in Form einer *PEGylierung* (PEG = Polyethylenglycol) modifiziert. Im Detail handelt es sich dabei um eine Verbindung aus PEG-Monomethylether mit einer molekularen Masse von 750 und 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan (= PICS), welches kovalent an die Partikeloberfläche gebunden wurde. Diese Maßnahme diente der sterischen Stabilisierung der NPs.

#### 2.3.4.4 PBio.S5

Fluoreszenzfarbstoff: ATTO 647 NHS-ester (ATTO-TEC GmbH, Abbildung 2.3.4.4a)

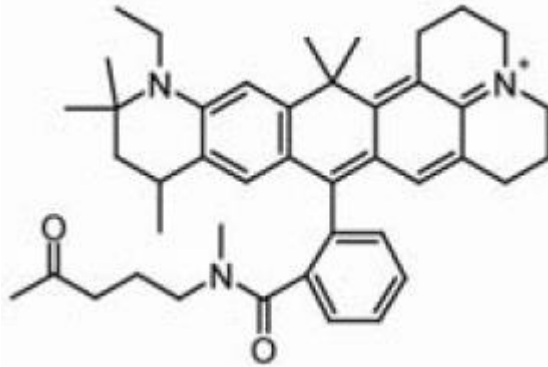
Fluoreszenzdaten:  $\lambda_{\text{Abs}} = 644 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 669 \text{ nm}$

Feststoffgehalt: 0,57 % (m/V)

pH-Wert: 8,15

Zetapotential [mV]: -49

d90 = 112,6 nm



**Abbildung 2.3.4.4a:** Atto 647 N (ATTO-TEC GmbH). Strukturformel entnommen aus Eggeling et al., 2009 Supplementary Information.

#### 2.3.4.5 PBio.S5.PICS750

Fluoreszenzfarbstoff: ATTO 647 NHS-ester (ATTO-TEC GmbH, 2.3.4.4a)

Fluoreszenzdaten:  $\lambda_{\text{Abs}} = 644 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 669 \text{ nm}$

Feststoffgehalt: 0,72 % (m/V)

pH-Wert: 8,39

Zetapotential [mV]: -35

d90 = 119,7 nm

Oberflächenmodifikation vlg. PBio.S4.PICS750

## 2.4 Vitalitätstest – MTT-Assay

### 2.4.1 Lösungen

#### MTT-Stocklösung (5 mg/ml):

MTT (Sigma)		50 mg
PBS	ad	10,0 ml

#### Lagerung:

Bis zu zwei Wochen lichtgeschützt bei 4° C oder sechs Monate bei 0° C.

#### Lysereagens:

DMSO		100 %
------	--	-------

### 2.4.2 Verdünnungsreihen der NP-Suspensionen

Die ZrO<sub>2</sub>-NPs in 10%iger Essigsäure und TODS-stabilisierte ZrO<sub>2</sub>-Suspension wurden nach der gleichen Vorgehensweise mit Kulturmedium verdünnt. Ausgehend von einer 40%igen (m/V) Suspension fand zunächst eine Verdünnung der NP auf 0,4 g/l statt. Rechnerisch ergibt sich beispielsweise für die ZrO<sub>2</sub>-NPs in 10%iger Essigsäure mit einem Durchmesser von 30 nm in einer Konzentration von 0,4 g/l eine ZrO<sub>2</sub>-Oberfläche von 2960 mm<sup>2</sup> für die pro well applizierten 200 µl. Danach wurde wie in Abbildung 2.4.2a weiter verfahren. Ab einer Konzentration von 0,002 g/l wurde jeweils im Verhältnis 1:10 verdünnt (Abbildung 2.4.2a).



**Abbildung 2.4.2a:** Schematische Darstellung der Verdünnungsreihen für die  $ZrO_2$ -NP in 10%iger Essigsäure und TODS-stabilisierte  $ZrO_2$ -Suspension.

Die Ausgangskonzentration der TRIAMO-stabilisierte  $ZrO_2$ -Suspension betrug 273 g/l. Das Verdünnen der Suspension mit Kulturmedium erfolgte jeweils im Verhältnis 1:100 bis zur letzten Verdünnungsstufe mit einer Konzentration von  $2,73 \cdot 10^{-11}$  g/l.

### 2.4.3 Prinzip des Assays

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetten Formazankristallen. Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems katalysiert. Diese Enzyme sind nur in vitalen Zellen aktiv, sodass die Reduktion von MTT zu Formazan als Maß für die Vitalität der Zellen dient. Die Menge des gebildeten Formazans kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 – 600 nm bestimmt werden, da das Substrat MTT in diesem Bereich nicht absorbiert. Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen. Wichtig für eine aussagekräftige Bestimmung der Farbintensität ist eine vollständige Lyse der Zellen und das in Lösung bringen der Formazankristalle (Mosmann, 1983).

### 2.4.4 Bestimmung der Vitalität

Nach dem Aussäen in die 96 well-Platten (40.000 Zellen/200 $\mu$ l/well), wurden die Zellen mit den unterschiedlichen NP-Suspensionsverdünnungsreihen für 24 Stunden bei 37° C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 %  $CO_2$  inkubiert.



Anschließend wurde das Medium abgesaugt und in jedes zu untersuchende well 150 µl einer in RPMI 1:10 verdünnten MTT-Stocklösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37° C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die MTT-Verdünnung wieder abgesaugt und die in den wells verbliebenen Zellen mit jeweils 100 µl DMSO lysiert. Unmittelbar danach wurde der Ansatz geschüttelt und photometrisch mit dem TECAN sunrise Absorbance Reader ausgewertet (Mosmann, 1983).

### **2.5 Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test)**

Bevor die NP-Suspensionen in Versuchen verwendet wurden, unterzog man sie einem LAL-Test (LONZA/CAMBREX PYROGENT® Cat.No. N183, East Rutherford, USA).

Der LAL-Test wurde durchgeführt, um die Anwesenheit Gram negativer Bakterien-Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) ausschließen zu können. Diese Maßnahme war sehr wichtig, da ausgeschlossen werden musste, dass z.B. Zytoskelettveränderungen oder Zytokinfreisetzung unter Einfluss von Pyrogenen stattfanden.

LAL ist ein wässriger Amöbozytenextrakt des *Limulus polyphemus* (Pfeilschwanzkrebs). Die Gerinnung des Lysats ist ein eindeutiger Hinweis auf die Anwesenheit von o.g. Endotoxinen. Durchgeführt wurde der Test unter Einbeziehen der Positiv- und Negativkontrollen nach Anweisung des Herstellers. Eine Beeinflussung der NP-Suspensionen auf die Aussagekraft des Tests konnte durch zusätzliche Kontrollexperimente mit der jeweiligen Positivkontrolle ausgeschlossen werden. Die untere Nachweisgrenze des Tests für LPS lag bei 0,03 EU/ml.

## 2.6 Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin

### 2.6.1 Lösungen

#### Paraformaldehyd-Lösung 3,7 %:

Paraformaldehyd		3,7 g
PBS	ad	100 ml

#### Triton X-100 0,1 %:

Triton X-100		0,1 ml
PBS	ad	100 ml

#### BSA-Lösung 1 %:

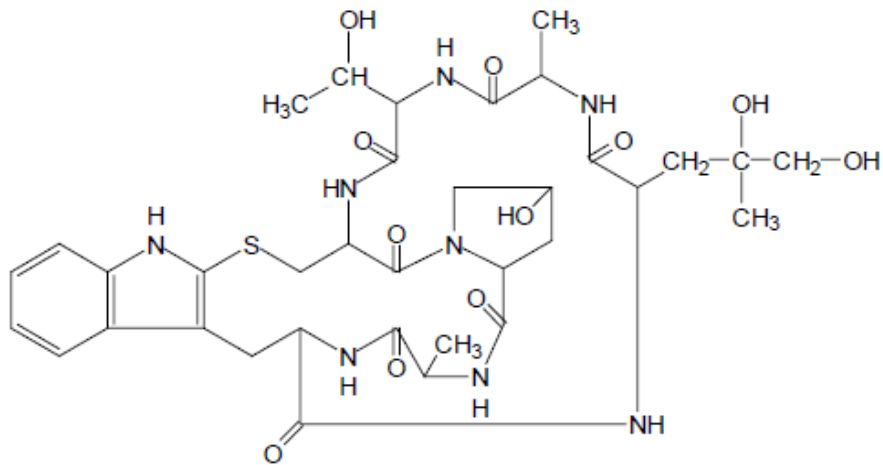
BSA		1.0 g
PBS	ad	100 ml

#### Phalloidin-TRITC P1951 (Sigma):

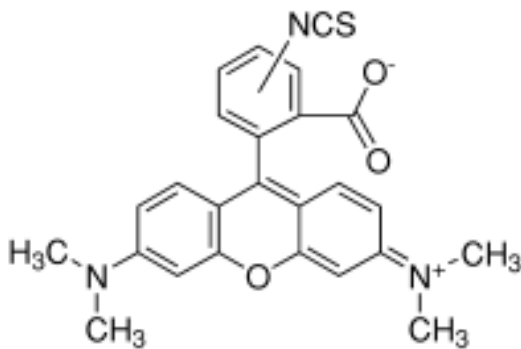
Die Konzentration der Stock-Lösung lag bei 76,6  $\mu\text{M}$  in Dimethylsulfoxid (DMSO). Für die Bindungsreaktion im Assay wurde die Stock-Lösung kurz vor der Anwendung im Verhältnis 1:200 mit PBS verdünnt. Die Endkonzentration an Phalloidin-TRITC lag somit bei 0,38  $\mu\text{M}$ .

Fluoreszenzdaten:  $\lambda_{\text{Abs}} = 540 - 545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 570 - 573 \text{ nm}$

Lagerung: vor Licht geschützt bei  $-20^\circ \text{C}$ .



**Abbildung 2.6.1a:** Phalloidin. Strukturformel von [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) entnommen.

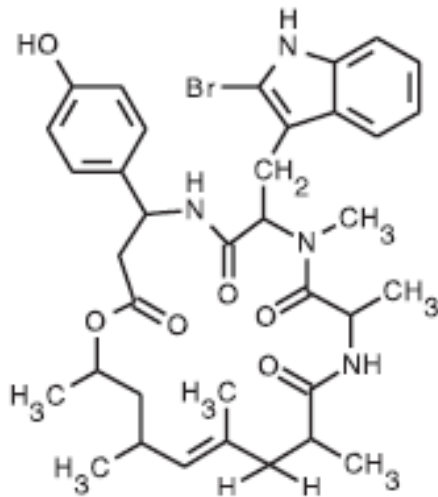


**Abbildung 2.6.1b:** Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC). Strukturformel von [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) entnommen.

### Jasplakinolide J7473 (Invitrogen):

Die Konzentration der Stock-Lösung lag bei 100  $\mu\text{M}$  in DMSO. Für die Bindungsreaktion im Assay wurde die Stock-Lösung kurz vor der Anwendung im Verhältnis 1:100 mit Kulturmedium verdünnt. Die Endkonzentration an Jasplakinolide lag somit bei 1  $\mu\text{M}$ .

Lagerung: vor Licht geschützt bei  $-20^\circ\text{C}$ .



**Abbildung 2.6.1c:** Jasplakinolide. Strukturformel von [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) entnommen.

## 2.6.2 Grundlagen des Assays

Im Bezug auf die in Kapitel 1 erläuterte Bedeutsamkeit des dynamischen Aktin-Zytoskeletts im Zusammenhang mit den Aufnahmeprozessen von Partikeln in die Zelle sollten quantitative Veränderungen des im Zytosol lokalisierten filamentären Aktins in Abhängigkeit einer Inkubation mit NPs gemessen werden. Glomeruläres und filamentäres Aktin befinden sich stets in einem dynamischen Gleichgewicht (Kapitel 1.3). Phalloidin gehört als bicyclisches Heptapeptid zu den Phallootoxinen, die aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) stammen und wirkt als Zellgift, indem es spezifisch an F-Aktin bindet (Cooper 1987). Zur flurometrischen Detektion wurde ein Konjugat aus Phalloidin und dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC) verwendet (Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate, Sigma-Aldrich, Faulstich et al., 1983).

### 2.6.3 Durchführung

Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellsuspensionen mit einer Zelldichte von 250.000 Zellen/ml zu je 50.000 Zellen pro well auf transparente *96 well plates* (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) ausgesät. THP-1 wurden wie in Kapitel 2.1.9 ausdifferenziert, humane Lungenmakrophagen vor dem Aussäen in die *96 well plates* entsprechend Kapitel 2.1.5.3 trypsiniert.

Nach Vollendung der Inkubation im Brutschrank bei 37° C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Quantifizierung von F-Aktin nach Kiemer et al., 2002c (modifiziert). Dazu wurden die konfluenten Zellrasen in den einzelnen wells zur Fixierung für zehn Minuten bei RT mit 3,7 %-iger Paraformaldehyd-Lösung behandelt. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei RT durchgeführt. Auf eine zehnmünütige Permeabilisierung mit einer 0,1 %-igen Lösung von Triton-X 100 folgte ein 30-minütiges Blocking mit einer 1 %-igen BSA-Lösung. Es folgte die Färbung des intrazellulär gebildeten F-Aktins während einer halbstündigen Bindungsreaktion mit Phalloidin-TRITC (0,38 µM) unter Lichtausschluss. Nach den jeweiligen Schritten wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Es folgte eine methanolische Extraktion des Phalloidin-TRITC mit je 100 µl pro well und anschließendem Übertragen der methanolischen Extrakte auf schwarze *half area plates* mit *96 wells* (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland). Die fluorometrische Messung wurde mit dem Wallac-Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter durchgeführt. Die Exzitationswellenlänge des Fluorophors betrug 544 nm, die gemessene Emission lag bei 572 nm.

## 2.7 Dynamische Lichtstreuung

Zur Ermittlung der Partikelgrößen und Bestimmung der Größenverteilung innerhalb der zu untersuchenden NP-Suspensionen wurden Messungen durchgeführt, die auf dem Prinzip der *dynamischen Lichtstreuung* (DLS) basieren. Die in einer flüssigen Phase dispergierten Partikel besitzen die Eigenschaft, das monochromatische Licht des eingesetzten Lasers zu streuen. Ausgehend von diesem Effekt lässt sich die Partikelgröße ableiten. Die dispergierten Partikel werden von den thermisch angeregten Teilchen der äußeren flüssigen Phase angestoßen, was zur Bewegung der Teilchen in unterschiedlichste Richtungen führt und als *Brownsche Molekularbewegung* bezeichnet wird. Die Verfahren der DLS ermöglichen die Messung der Partikelbewegung, woraus sich über die Stokes-Einstein-Beziehung mit dem ermittelten hydrodynamischen Partikelradius der zugehörige Diffusionskoeffizient ableiten lässt (Gleichung 1).

Gleichung 1:

$$D = \frac{k \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

$D$  = Diffusionskoeffizient der Partikel

$k$  = Boltzmannkonstante

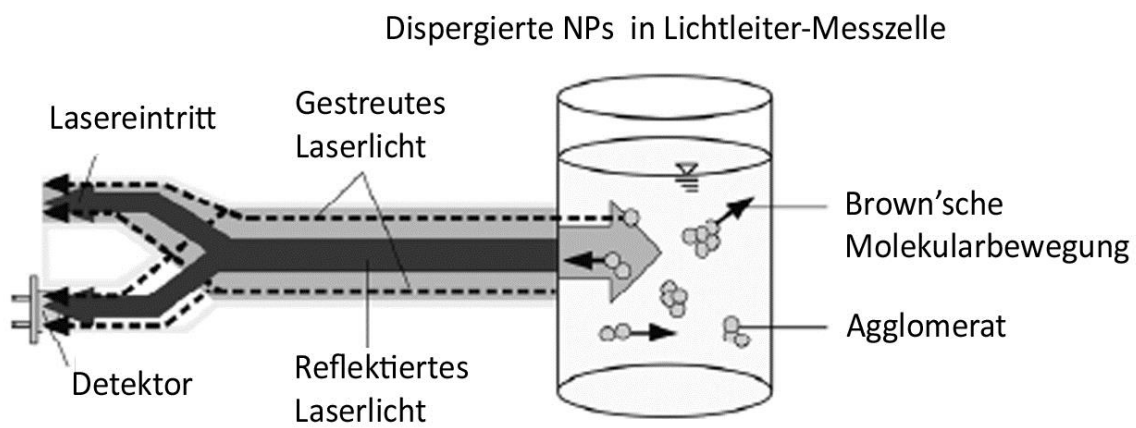
$T$  = Temperatur

$\eta$  = Viskosität des Dispersionsmediums

$r$  = hydrodynamischer Partikelradius

Sämtliche DLS-Messungen wurden optional mit den Rückstreu-Teilchengrößenanalysatoren MICROTRAC UPA 150 (Ultrafine particle analyzer, Microtrac Inc.) bzw. Nanotrak Particle Size Analyser NPA 250 (Microtrac Inc.) des Leibniz Instituts für Neue Materialien gGmbH Saarbrücken durchgeführt. Das hierbei angewandte Messverfahren wird als *Controlled Reference Method* (CRM) bezeichnet. Dessen Berechnungsgrundlage für den Diffusionskoeffizient der Partikel leitet sich aus der Analyse von durch Partikel erzeugtem Streulicht und der daraus resultierenden Frequenzverschiebung ab. Letztere lässt sich durch den Dopplereffekt erklären, da

Partikel in der randomisierten Brownschen Molekularbewegung Laserlicht zurückstreuen und so ein für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten bestimmendes Spektrum von unterschiedlichen Frequenzverschiebungen aufweisen. Die Lichtleiter-Messzelle besteht aus Saphirglas, welches den einfallenden Lichtstrahl an dessen Grenzfläche ohne Dopplereffekt zum Teil reflektiert, wodurch er zusätzlich als Referenz wirkt und eine heterodyne Detektion ermöglicht (Abbildung 2.7a).



**Abbildung 2.7a:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Controlled Reference Method (Aus: Englert, 2009, modifizierte Abbildung).

## 2.8 Herstellung von GST-PBD/GST-RBD Sepharose beads

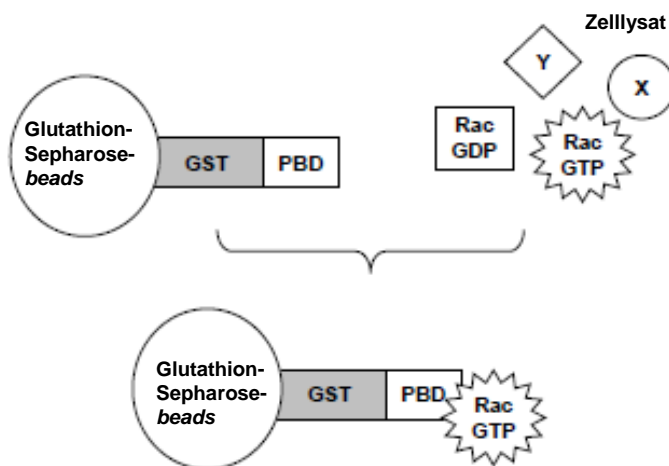
Die mit pGEX-4T-3-PBD (RBD: pGEX-4T-3-RBD; Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) transformierten *Escherichia coli* XL1-Blue wurden über Nacht in 100 ml (RBD: 200 ml) Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Medium bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Der Übernachtskultur wurden 1.900 ml (RBD: 1.800 ml) des Ampicillinhaltigen LB-Mediums hinzugefügt. Nach 90 Minuten bei 37° C erfolgte eine Überprüfung des Bakterienwachstums anhand der *Optischen Dichte* (OD) bei 600 nm, die im Optimum bei 0,6 (RBD: 0,9) lag. Um die Expression des *lac promoter-linked GST-PBD gene* bzw. *lac promoter-linked GST-RBD gene* zu induzieren, wurde Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt (Endkonzentration: 0,3 mM für PBD und 0,8 mM für RBD). Einer dreistündigen Inkubation bei 30° C im Bakterieneschüttler zur Expression des jeweiligen GST-PBD/RBD Fusionsproteins schlossen sich eine Zentrifugation und die Bakterienlyse an. Der Lysepuffer für das Bakterienpellet setzte sich zusammen aus: Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, Leupeptin 1 µg/ml und Aprotinin 10 µg/ml. Das Lysat wurde sonifiziert und erneut zentrifugiert. Der daraus entstandene Überstand wurde für eine Stunde bei 4° C mit einer Suspension von Glutathion Sepharose beads (GE Healthcare, Deutschland) inkubiert und anschließend fünf Mal mit einem Puffer aus Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,1 mM und PMSF 0,1 mM gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei -80° C (Benard et al., 1999, Fürst, 2005).



## 2.9 Pulldown Assay

### 2.9.1 Prinzip des Assays

Der *Pulldown Assay* dient dem Nachweis aktivierter Rho-GTPasen, die nur in der jeweils aktivierten Konformation an entsprechend spezifische GTPase bindende Domänen von Effektorproteinen binden. Rac1 (Rac-GTP) und Cdc42 (Cdc-Rac) binden an die *p21-binding domain* (PBD) der p21 Aktivierten Kinase 1 (PAK1), RhoA (Rho-GTP) an das Protein Rhotekin (RBD). Die spezifischen Effektoren liegen als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) vor und sind an Glutathion Sepharose *beads* gebunden, wodurch die Affinitätspräzipitation ermöglicht wird (Benard et al., 1999; Abbildung 2.9.1a).



**Abbildung 2.9.1a:** Schematische Darstellung des Pulldown Assays am Beispiel Rac. Der Assay ermöglicht die spezifische Isolation von Rac im aktivierten Zustand (Rac-GTP) ausgehend vom Zelllysate. Abkürzungen: Glutathion-S-Transferase (GST), *p21-binding domain* (PBD). Abbildung aus Fürst 2005, modifiziert.

### 2.9.2 Durchführung des Assays

Für die Durchführung des Pulldown Assays wurde die Vorgehensweise nach Benard et al., 1999 bzw. Fürst 2005 modifiziert. In 100 mm Kulturschalen kultivierte konfluente Makrophagen wurden vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen und danach zur Lyse für den Rac1-Pulldown mit eiskaltem GTP $\gamma$ S-PBD-Puffer mit der Zusammensetzung Tris pH 8,0 25 mM, DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM und Triton X-100 1 % versetzt. Im Falle eines RhoA-Pulldowns ersetzte der RBD-Puffer mit Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Glycerol 10 %, NaF 5 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 1 % den GTP $\gamma$ S-PBD-Puffer. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen abgeschabt, mit dem Puffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und für 15 Minuten bei 4° C stark geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (14.000 *rpm*, 4° C, 10 Minuten) wurde der Überstand bei -80° C eingelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford. Die eingesetzte Proteinmenge pro Pulldown lag jeweils bei 200  $\mu$ g.

Zur Positivkontrolle für den Rac1-Pulldown diente der durch GTP $\gamma$ S induzierte Austausch von Rac-GDP zu Rac-GTP durch Zugabe von GTP $\gamma$ S (10 mM) und EDTA (100 mM). Inkubiert wurde für 8 Minuten bei 30° C. Durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub> (1 M) konnte die Reaktion gestoppt werden.

Die Ansätze wurden durch jeweils 15  $\mu$ l *PBD beads* bzw. *RBD beads* ergänzt und zum eigentlichen Pulldown für eine Stunde bei 4° C vorsichtig geschüttelt. Danach wurde das jeweilige Präzipitat fünf Mal mit PBD-Puffer Tris pH 8,0 25 mM, DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 1 %, bzw. RBD-Puffer gewaschen und zentrifugiert (8.000 *rpm*, 4° C, 5 Minuten). Die Proben wurden mit je 15  $\mu$ l Roti<sup>®</sup>-Load 1 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) versetzt und 5 Minuten (PBD) bzw. 15 Minuten (RBD) bei 95° C aufgekocht, bevor sie wieder auf Eis gelagert wurden, um darauf mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Kapitel 2.9.3) und *Western Blotting* (Kapitel 2.9.4) weiter verarbeitet zu werden. Ausgewertet wurde mittels Immundetektion (Kapitel 2.9.5).

### 2.9.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### 2.9.3.1 Lösungen

SDS-Polyacrylamidgel zusammengesetzt aus folgenden Sammel- und Trenngelen:

Sammelgel (5 % Acrylamid) :

H <sub>2</sub> O	6,8 ml
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 %/0,8 %)	1,7 ml
Tris Base (1,0 M, pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10 % [m/V])	100 µl
APS (10 % [m/V])	100 µl
TEMED	10 µl

Trenngel (12 % Acrylamid):

H <sub>2</sub> O	6,6 ml
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 %/0,8 %)	8 ml
Tris Base (1,5 M, pH 8,0)	5 ml
SDS (10 % [m/V])	200 µl
APS (10 % [m/V])	200 µl
TEMED	20 µl

Elektrophoresepuffer:

Tris Base	24,8 mM
Glycin	1,92 mM
SDS	0,1 % [m/V]
in H <sub>2</sub> O	

### 2.9.3.2 Durchführung

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen nach Molekulargewicht. Die durchgeführte Methode richtet sich nach den grundlegenden Erkenntnissen von Laemmli 1970. Um die zu untersuchenden Rho-GTPasen mittels der SDS-PAGE bzw. Western Blotting nachweisen zu können, wurde der Trennbereich auf 12 bis 60 Kilodalton (kD) eingestellt. Folglich wurde das jeweils verwendete Trenngel auf 12 % SDS [m/V] eingestellt, welches wiederum durch die stark negative Ladung und den denaturierenden Effekt der im Lade-Puffer enthaltenen denaturierenden Agenzien Dithiothreitol (DTT) und 2-Mercaptoethanol den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts proportional zur relativen Wanderungsstrecke der Proteine im Gel darstellen konnte. Um das Molekulargewicht zuordnen zu können lief stets ein gefärbter Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder #0671, Fermentas, St.Leon- Rot, Deutschland) im Elektrophoresegel mit. Nach dem Beladen des in Elektrophoresepuffer gelagerten Gels mit den Proben wurde die Elektrophorese gestartet. Zu Beginn waren die Bedingungen für den jeweiligen Elektrophorese-Lauf 10 Minuten bei 40 mA und 80 Volt, dann weitere 75 Minuten bei einer Spannung von 140 Volt. Das zur Durchführung der SDS-PAGE benötigte Equipment stammte von der Firma BioRad (München, Deutschland).

### 2.9.4 Western Blot

Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die fraktionierten Proteine mittels Western Blot auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) transferiert. Die PVDF-Membran (Immobilion-FS, Millipore) hatte eine Porengröße 0,45 µm und wurde zunächst für 30 Sekunden in Methanol inkubiert, bevor sie für 30 Minuten in Transferpuffer (Tris Base 24,8 mM, Glycin 1,92 mM, SDS (10 % [m/V]) 0,05 % [m/V], Methanol 20 % [m/V] in H<sub>2</sub>O) equilibriert wurde. Als Apparatur diente das *tank blotting system* von BioRad (München, Deutschland). Ein Aufbau nach der Sandwich-Methode beinhaltete pro Gel je zwei Schwämme, zwei Stücke Blottingpapier und eine zugeschnittene PVDF-Membran, die zunächst alle in Transferpuffer equilibriert und schließlich luftblasenfrei zusammengebaut werden mussten. Der Western Blot wurde bei einer Stromstärke von 80 mA in eisgekühltem

Transferpuffer über Nacht durchgeführt. Nach dem Auseinanderbauen am nächsten Morgen fand zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen auf der Membran ein *Blocking* durch einstündiges Inkubieren mit *Rockland Blocking Puffer* (Rockland blocking buffer, RBB, Rockland, Gilbertsville, USA) statt.

## 2.9.5 Immundetektion

### 2.9.5.1 Verwendete Antikörper

#### Primäre Antikörper:

##### Anti-human RhoA mouse IgG:

(sc-418, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), Verdünnung: 1:500 in RBB

##### Anti-human Rac1 mouse IgG:

(clone 23A8, Millipore, USA), Verdünnung: 1:1.000 in RBB

#### Sekundäre Antikörper:

##### IRDye<sup>®</sup> 800CW conjugated goat anti-mouse IgG:

(LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland), Verdünnung: 1:5.000 in RBB

### 2.9.5.2 Durchführung

Nach dem *Blocking* (Kapitel 2.9.4) erfolgte die Inkubation mit den unter 2.9.5.1 angegebenen Antikörperverdünnungen. Im Allgemeinen fanden jegliche Inkubation der Membran, sowie die fünfminütigen Waschschriffe unter permanentem vorsichtigem Schütteln statt. Die Inkubationsdauer für primäre Antikörper betrug 2,5 Stunden bei RT, sekundäre Antikörper hingegen banden über einen Zeitraum von 45 Minuten bis zu einer Stunde bei RT unter Lichtausschluss mit den Proteinen auf der Membran. Nach jeder Inkubation mit Antikörperlösungen folgten zwei Waschschriffe mit PBST (Tween<sup>®</sup> 20 0,1 % [V/V] in PBS) und einem Waschschriff mit PBS bei RT. Das ODYSSEY<sup>®</sup> Infrared Imaging System inkl. Odyssey Software (LI-COR<sup>®</sup>, LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland) wurde zur Detektion verwendet.

## 2.10 Phagozytose-Assay

Um die Partikelaufnahme durch Makrophagen zu visualisieren, wurden die Zellen mit sphärischen FITC-markierten LBs (= *Latexbeads*, Fluoresbrite Carboxylated YG microspheres; Polysciences, Warrington, PA, USA) inkubiert. Der Durchmesser der LBs lag bei 1,75  $\mu\text{m}$ . Die isolierten humanen AMs bzw. IMs wurden nach dem Trypsinieren mit einer Dichte von 150.000 Zellen/ml ausgesät. Als Substrate für die Zellen dienten in 24 well-Platten eingelagerte runde Deckgläschen. Pro well wurde ein Volumen von 1 ml Zellsuspension appliziert. Die Inkubationsdauer in Vollmedium betrug 4 Stunden, wobei das Mengenverhältnis von Latexbeads zu Zellen bei 100:1 lag.

Um die Internalisierung gezielt zu inhibieren, wurde eine Stunde vor der LB-Zugabe Cytochalasin D (10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) hinzugefügt. Alternativ wurden die Makrophagen bei 4° C inkubiert. Die Dauer der Präinkubation der Zellen bei 4° C betrug eine Stunde.

Nach Entfernen des LB-haltigen Mediums wurden die Zellen 4 - 5 Mal mit eiskühlem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 3,7 % Paraformaldehyd enthaltendem PBS für 10 min fixiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 10 min mit 0,25 % Triton X-100/PBS und das Blockieren unspezifischer Bindungen für 30 min mit 1 % BSA in PBS. F-Aktin wurde mit TRITC-Phalloidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), der Zellkern mit TOTO-3 Iodid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wie in Kapitel 2.12 beschrieben gefärbt und schließlich eingedeckelt. Die CLSM-Messungen erfolgten mit dem LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### Excitations- und Emissionswellenlängen der Fluorophore:

TRITC-Phalloidin:  $\lambda_{\text{Ex}} = 540 - 545 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 570 - 573 \text{ nm}$

TOTO-3-Iodid:  $\lambda_{\text{Ex}} = 642 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 660 \text{ nm}$

FITC:  $\lambda_{\text{Ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$

## 2.11 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) zum Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B

### 2.11.1 Grundlagen zum Assay

Der in dieser Arbeit angewandte *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) stellt eine Methode dar, mit der DNA-Protein Interaktionen nachgewiesen werden können. Das Prinzip dieses Assays basiert auf den unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten von DNA-Proteinkomplexen im Vergleich zu entsprechenden DNA-Oligonukleotiden ohne spezifische Proteinbindung während der Gelelektrophorese. Zur Bindung und Detektierbarkeit von NF- $\kappa$ B wurden IRDye 700 markierte NF- $\kappa$ B-Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) verwendet.

### 2.11.2 Lösungen

#### Hypotoner Puffer A

HEPES/KOH pH 7,9	10 mM
EDTA	0,1 mM
KCl	10 mM
EGTA	0,1 mM
Bei Bedarf frisch hinzugefügt:	
DTT (in H <sub>2</sub> O)	1 mM
PMSF (in Methanol)	0,5 mM



Hypertoner Puffer B

HEPES/KOH pH 7,9	20 mM
NaCl	400 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Glycerol	25 % [v/v]
Bei Bedarf frisch hinzugefügt:	
DTT (in H <sub>2</sub> O)	1 mM
PMSF (in Methanol)	0,5 mM

PBS (phosphate buffered saline)

Vgl. Kapitel 2.1.1

TBE Puffer

TRIS	89,1 mM
Borsäure	89,1 mM
EDTA	2,21 mM
in H <sub>2</sub> O	

7%iges Polyacrylamidgel

H <sub>2</sub> O	23,5 ml
40%iger Polyacrylamid Stock (Polyacrylamid-Bisacrylamide ratio = 29:1)	7,5 ml
TRIS (1 M, pH 7.5)	2,0 ml
Glycin (1 M)	7,6 ml
EDTA (0.5 M)	160 µl
APS (10 % [m/v])	200 µl
TEMED	30 µl

### 2.11.3 Extraktion der Kernproteine

Zur Gewinnung der nukleären Proteine dienten die in Kapitel 2.1.5.2 vorgestellten IMs, die wie beschrieben isoliert und kultiviert wurden. Während der gesamten Extraktion wurde auf Eis gearbeitet. Die adhären Zellen wurden kurz mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) vom Substrat entfernt. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert (5.000 x g, 5 min, 4° C) und die daraus entstandenen Zellpellets in je 400 µl hypotonischen Puffer A resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zugabe von Nonidet P-40 10 % [v/v] mit anschließendem Vortexen und erneutem Zentrifugieren (12.000 x g, 1 min, 4° C). Die Pellets mit den darin enthaltenen nukleären Proteinen wurden mit je 20 µl hypertonischem Puffer B resuspendiert, wodurch die nukleären Proteine extrahiert wurden. Die Inkubationsdauer der Lysate auf Eis betrug 30 Minuten. Während dieses Zeitraums wurden die Lysate 10 Mal gevortext. Die Extrakte wurden erneut zentrifugiert (12.000 x g, 1 min, 4° C), die Überstände mit den darin enthaltenen nukleären Proteinen in jeweils frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80° C für den EMSA eingelagert.

### 2.11.4 Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll für „Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) Using IRDye<sup>®</sup> Oligonucleotides“ von LI-COR<sup>®</sup> Biosciences.

In einem 20 µl-Reaktionsansatz wurden äquivalente Mengen an nukleärem Protein für 20 min bei RT inkubiert. Das Reaktionsvolumen setzte sich zusammen aus H<sub>2</sub>O, 10 mM TRIS pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2,5 mM DTT/0,25 % Tween 20, 2 µg poly(dIdC) und 25 nM IRDye 700 markierte Oligonukleotiden. Die für den Supershift relevanten Ansätze enthielten zusätzlich jeweils 1 µg der entsprechenden Antikörper, welche dem Reaktionsansatz 10 Minuten vor den IRDye 700 markierten Oligonukleotiden hinzugefügt wurden.

Die verwendeten Oligonukleotide beinhalteten die Konsensussequenzen für NF-κB

(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')

oder AP-1

(5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3')

und waren jeweils am 5'-Ende mit IRDye 700 markiert. Durch Zugabe der doppelten Menge an Kompetitoren in Form von unmarkierten NF-κB-/AP-1-Oligonukleotiden sollte das spezifische Bindungsverhalten der DNA-Proteinkomplexe gezeigt werden.

Zur Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide fand eine 5-minütige Inkubation bei 95° C statt, gefolgt von einem langsamen Abkühlvorgang. In einem 7 %-igen Polyacrylamidgel wurden die DNA-Proteinkomplexe mittels Elektrophorese in TBE-Puffer aufgetrennt. Die Apparaturen zur Umsetzung dieser Arbeitsschritte stammten von der Firma BioRad (München, Deutschland). Die Detektion erfolgte am ODYSSEY<sup>®</sup> Infrared Imaging System (LI-COR<sup>®</sup>, LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland).

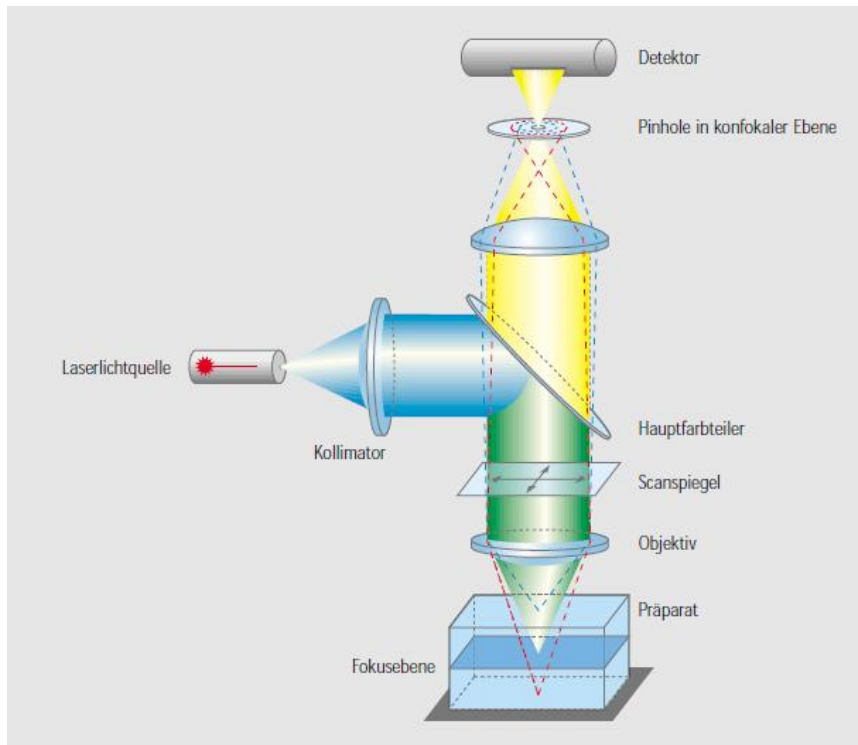
## 2.12 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

### 2.12.1 Grundlagen

Bei der Konfokalen Laser-Rastermikroskopie (CLSM = *Confocal Laser Scanning Microscopy*) rastert ein Laserstrahl zeilenweise Punkt für Punkt das zu betrachtende Objekt in der eingestellten Fokusebene ab. Fluoreszenzmoleküle, die sich im Lichtweg des aktiven Laserstrahls befinden, werden durch die monochromatische Lichtquelle angeregt – Fluoreszenzsignale werden emittiert und gelangen durch die für die CLSM charakteristische Lochblende (*pinhole*) auf einen Detektor. Streulicht aus den Objektebenen außerhalb der Fokusebene prallt an der Lochblende ab und führt somit nicht zur Verminderung der Bildqualität wie bei der „konventionellen“ (Fluoreszenz-)Mikroskopie. Folglich kann man in Abhängigkeit von der Pinhole-Einstellung und der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs die Qualität und Dicke des sogenannten optischen Schnittes optimieren. Für die in Kapitel 3.6 aufgeführten Präparate wurde das Zeiss LSM 510 Meta zur Messung benutzt. Das LSM 510 Meta arbeitet nicht nur mit einer ganzen Reihe an dichroitischen Filtern, sondern enthält auch einen Metadetektor. Dieser ermöglicht es, mehrere frei definierbare Detektionsbanden virtuellen Kanälen zuzuordnen und lässt dadurch eine noch exaktere Detektion der Fluoreszenzsignale zu ([www.zeiss.de](http://www.zeiss.de)).

Das Zeiss LSM 510 Meta verfügt zur Anregung der Fluorophore über folgende Laser:

Argon-Ionen-Laser	458, 477, 488, 514 nm
HeNe 543, 633	543, 633 nm
Chameleon 2-Photonenlaser (2P)	705 – 980 nm



**Abbildung 2.12.1a:** Strahlengang im konfokalen Laser-Rastermikroskop ([www.zeiss.de](http://www.zeiss.de))

### 2.12.2 Präparation der Zellen für die Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Für die Betrachtung mittels CLSM wurden humane AMs und differenzierte THP-1 präpariert. Als Substrate für die adhärennten Zellen dienten je nach Ansatz optional in 24 well-Platten eingelagerte runde Deckgläschen oder Objektträger mit abnehmbarer Kammer (*Chamber slides*). Die Substrate waren jeweils aus Glas. Pro well wurden 150.000 Zellen appliziert. Die applizierte Zellzahl pro Kammer lag bei 75.000. THP-1 wurden wie in Kapitel 2.1.9 geschildert mit PMA ausdifferenziert.

### 2.12.3 Färbung von F-Aktin

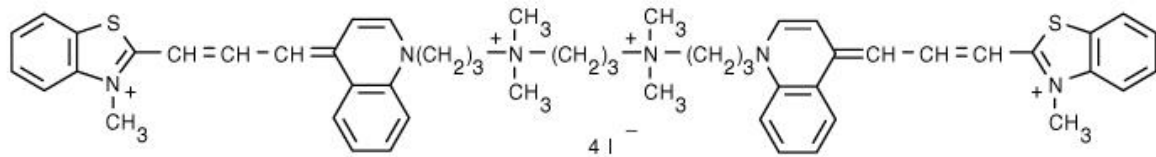
Ausgehend von 2.12.2 wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd (3,7 % in PBS) fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur mit Triton X 100 (0,25 % in PBS) permeabilisiert. Anschließend folgten ein erneuter Waschschrift und das *Blocking* mit einer frisch hergestellten BSA-Lösung (1 % in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen. Im Folgenden wurden die Zellen für 30 min unter Lichtausschluss mit einer 0,38  $\mu\text{M}$  TRITC-Phalloidin-Lösung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zweimal mit PBS gewaschen.

Als alternative Variante zum o.g. Fixieren und Permeabilisieren fand nach dem Waschen der Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eine 15-minütige Inkubation mit bereits vorgekühltem  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Ethanol 70 % (V/V) statt. Nach Absaugen des Ethanols folgte das *Blocking* durch 10%ige FCS/PBS-Lösung.

### 2.12.4 Zellkernfärbung

Interkalierende Effekte bestimmter Substanzen in DNA werden zur Betrachtung des Zellkerns genutzt. Die hier aufgeführten und verwendeten Stoffe sind zudem Fluorophore, die sich für die CLSM-Detektion eignen.

Erfolgte die Markierung des Zellkerns mit TOTO-3-Iodid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Abbildung 2.12.4a), wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen nach dem *Blocking* (Kapitel 2.12.3) bei RT für 20 min mit 1,67  $\mu\text{M}$  von TOTO-3-Iodid inkubiert, bevor das Präparat abschließend zweifach mit PBS gespült wurde ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).



**Abbildung 2.12.4a:** TOTO-3-Iodid;  $\lambda_{\text{Ex}} = 642 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 660 \text{ nm}$

### 2.12.5 Immunfärbung von $\alpha$ -Tubulin

Die adhärenenten Zellen (2.12.2) wurden zunächst mit  $-20^\circ \text{C}$  kaltem Ethanol fixiert und permeabilisiert. Darauf erfolgte das *Blocking* durch 10 %-ige FCS/PBS-Lösung (2.12.3). Im nächsten Schritt wurde das in den zu untersuchenden Zellen vorhandene  $\alpha$ -Tubulin selektiv mit primären Antikörpern (Sigma Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin Mouse IgG1 isotype #T9026; Verdünnung: 1:300) markiert. Die Inkubation dauerte eine Stunde bei RT. Nach drei Waschschrinen mit einer 1 % FCS/PBS-Lösung fand die Inkubation mit sekundären Antikörpern (Goat Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:100, Invitrogen) statt. Die Inkubationsdauer betrug bei RT ebenfalls eine Stunde. Abschließend musste das Präparat viermal für zehn Minuten mit PBS gespült werden.

Alexa Fluor 488:  $\lambda_{\text{Ex}} = 491 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 515 \text{ nm}$

### 2.12.6 Eindeckeln der Präparate

Zur mikroskopischen Betrachtung und Konservierung wurden die Präparate nach den in diesem Kapitel vorgestellten Färbungen mit Fluorsave<sup>TM</sup> Reagent (Calbiochem) eingedeckelt, d.h. es wurden vorsichtig ein bis zwei Tropfen Fluorsave<sup>TM</sup> Reagent (Calbiochem) auf das Substrat mit den Zellen pipettiert und unter Vermeidung von Luftblasenbildung und Scherkräften Objektträger und Deckgläschen zusammengeführt. Ausgehärtet wurden die Präparate über Nacht bei  $4^\circ \text{C}$  und unter Lichtausschluss.

### 2.13 Modellierung des intrazellulären Transports von Nanopartikeln

Die Internalisierung von NPs kann zu Agglomeration von Teilchenclustern in der Zelle führen. Oftmals findet die Entstehung der Teilchencluster im perinukleären Bereich der Zelle statt. Um den Einfluß auf den MT-basierten intrazellulären Transport der NPs zu charakterisieren und zu verstehen, wurde ein mesoskopisches Modell entwickelt, welches in der Umsetzung als stochastische Simulation die Dynamik der Teilchen in der Zelle realistisch beschreiben soll. Die Validierung des Modells anhand experimenteller Daten steht zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch aus.

Konfokalmikroskopische Messungen an humanen AMs und differenzierten THP-1 dienten zur Parametrisierung und Kalibrierung eines Zellmodells, dessen Grundelemente zum einen die Dynamik der MT-Filamente beschreiben und reproduzierbar machen sollte und zum anderen die intrazelluläre Dynamik der internalisierten NP beschreiben soll.

Die Strukturanalyse des MT-Netzwerks erfolgte dabei über die 2D Rekonstruktion der Zelle aus den für diese Arbeit durchgeführten CLSM-Messungen. Dazu wurden zur Glättung und Kontrastverbesserung verschiedene Algorithmen der mathematischen Bildanalyse angewandt, wie z.B. der *white-top-hat* Filter, die *Gammakorrektur* zur lokalen Modifikation des Grauwertes und ein Ecken-/Kohärenzverstärkender anisotroper Diffusionsfilter zur Unterdrückung des Rauschens. Die aufbereiteten Konfokalaufnahmen wurden dann zur Rekonstruktion des MT-Netzwerks benutzt. Dabei wurde angenommen, dass sich die MT-Filamente als Zufallswege mit endlicher Persistenzlänge beschreiben lassen. Auf diese Weise konnte eine vollständige Rekonstruktion des MT-Netzwerks aus einzelnen Filamenten erreicht werden. Die Rekonstruktion erlaubt die strukturelle Analyse des MT-Netzwerks durch Bestimmung der Persistenzlänge und damit die realistische Modellierung des Transportnetzwerks im Rahmen des stochastischen Modells.

Durchgeführt wurde die Erstellung des stochastischen Transportmodells in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ludger Santen. Die mathematische Bildanalyse wurde in der AG von Herrn Prof. Dr. Joachim Weickert durchgeführt.



## 2.14 Statistische Auswertung

Die Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten erfolgte jeweils in Form der arithmetischen Mittel mit den korrelierenden Standardabweichungen (SEM). Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Student's t-Test. (Microsoft® Excel 2002, Microsoft®, Redmond, USA) Die jeweilige Anzahl der unabhängigen Versuche sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben. Die Anzeige signifikanter Unterschiede richtete sich nach dem p-Wert  $p \leq 0,05$  (\*).

## 2.15 Verwendete Software

Zur Durchführung, Auswertung und Bearbeitung der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse diente die dazugehörige Gerätesoftware folgender Instrumente:

- *Zeiss LSM 510 Meta (LSM 510 Software und LSM Image Browser, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)*
- *Wallac Victor2 multilabel counter (Software Version 3.00 release 2, Wallac/PerkinElmer, Rodgau-Juedesheim, Deutschland)*
- *Sunrise<sup>TM</sup> absorbance reader (Software: Magellan, Gerät und Software von Tecan, Grödig/Salzburg, Austria)*
- *ODYSSEY<sup>®</sup> Infrared Imaging System (Software: Odyssey, Version 2.1.12, Gerät und Software von LI-COR<sup>®</sup>, LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland)*
- *BD Pathway 855 (Software: AttoVision, BD Biosciences, Kalifornien, USA)*
- *MICROTRAC UPA 150 (Analysis software version 7.02b, Microtrac Inc., Montgomery, PA, USA)*

- *Nanotrac Particle Size Analyser NPA 250* (Software: *Microtrac-FLEX 10.3.15*, Microtrac Inc., Montgomery, PA, USA)

Darüber hinaus wurden verwendet:

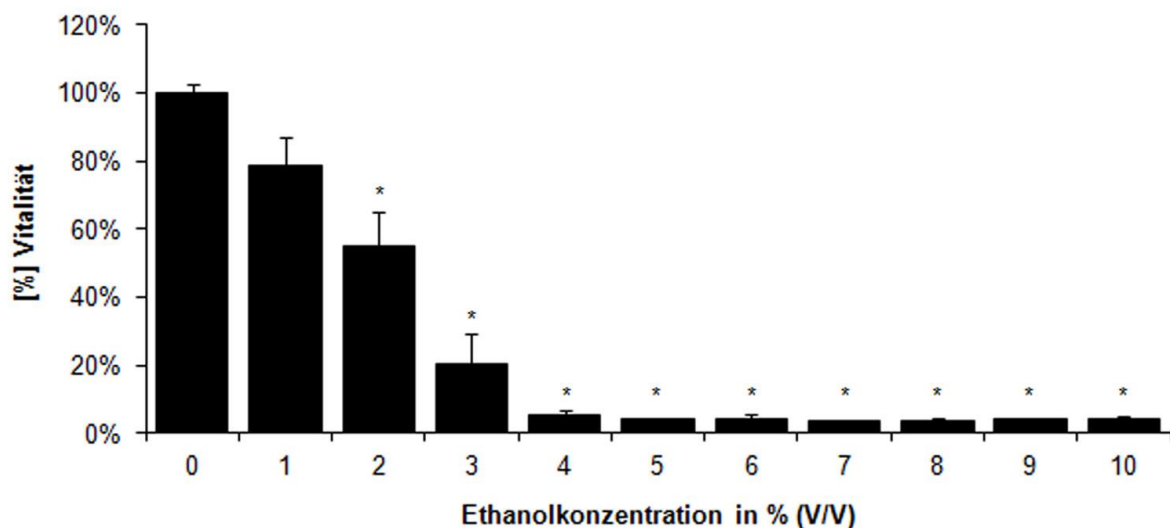
- *Adobe® Photoshop 7.0* (Adobe® Systems, München, Deutschland) für die grafische Bearbeitung der Abbildungen.
- *EndNote® Windows Version 8* (Thomson Reuters Corporation, New York, USA) als Literaturverwaltungsprogramm.
- *Microsoft® Excel 2002* (Microsoft®, Redmond, USA) zur Auswertung von Messdaten und Darstellung der Ergebnisse in Form von Zahlenwerten und Diagrammen, sowie zur statistischen Auswertung.
- *Microsoft® Word 2002* (Microsoft®, Redmond, USA) um diese Arbeit zu verfassen.
- *Adobe® Acrobat® Pro Version 9.0.0* (Adobe® Systems, München, Deutschland).

### **3. Ergebnisse**

### 3.1 MTT-Assay

#### 3.1.1 Vorversuch mit Ethanolverdünnungsreihe

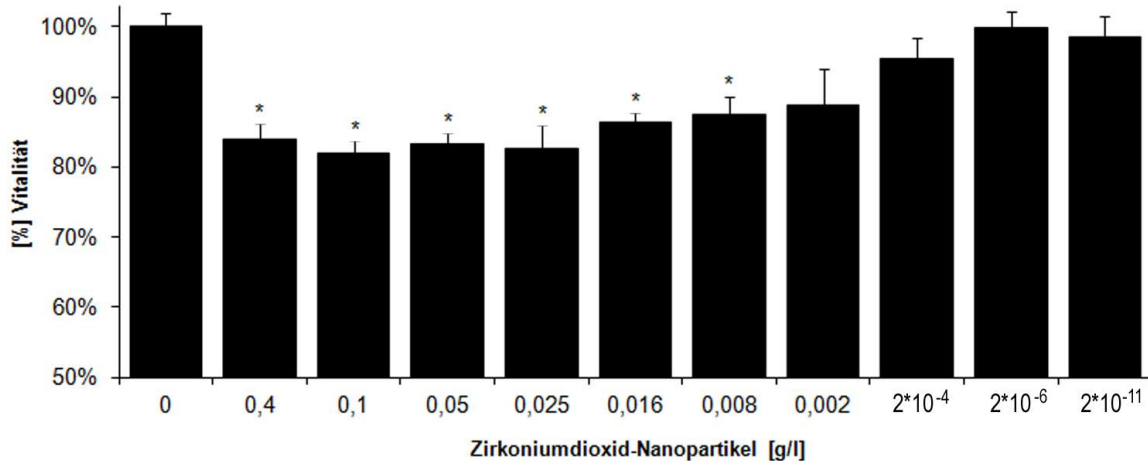
Zur Überprüfung und Sicherung der Validität des MTT-Assays wurde der Test im Vorfeld mit einer Ethanolverdünnungsreihe (1 – 10 % (V/V)) an ausdifferenzierten THP-1-Zellen durchgeführt. Wie erwartet zeigt das Ergebnis (Abbildung 3.1.1a) dieses Vorversuchs mit ansteigender Ethanolkonzentration eine kontinuierliche Abnahme der Zell-Vitalität nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden.



**Abbildung 3.1.1a:** MTT-Test: Abnahme der Vitalität von differenzierten THP-1-Zellen mit zunehmender Ethanol-Konzentration. SEM aus n=2; \*p < 0,05.

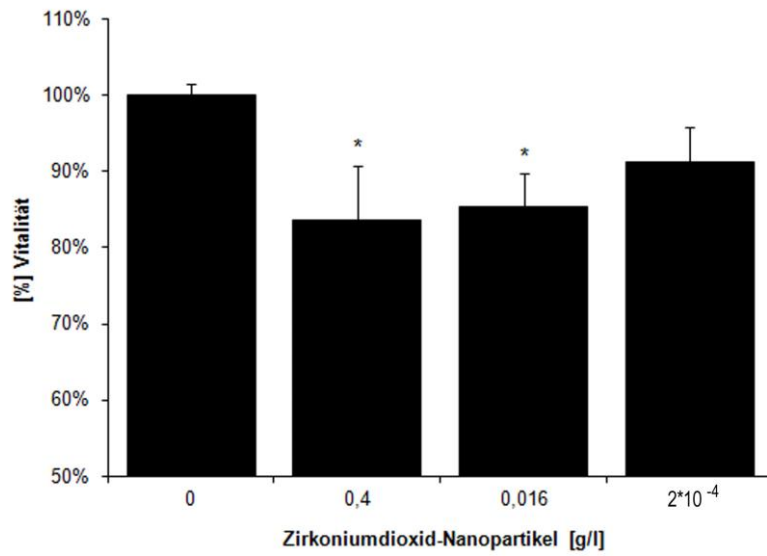
### 3.1.2 ZrO<sub>2</sub>-Nanopartikel

Aufgrund seiner Eigenschaftsvielfalt wie Feuerfestigkeit, hohe chemische Beständigkeit, hohe Bruchzähigkeit, etc. ist ZrO<sub>2</sub> ein wertvoller Werkstoff für die Industrie und findet beispielsweise breite Anwendung in der Ingenieurkeramik. Eine wichtige Rolle übernimmt der Werkstoff für den Einsatz auf den Gebieten der Gassensorik und Multilayertechniken (Knoll, 2001). Nanoskaliges ZrO<sub>2</sub> wie das hier verwendete, findet heutzutage Anwendung bei der Herstellung von kratzfesten Oberflächen und wird somit industriell in großen Mengen erzeugt. Anhand des MTT-Assays war bei ausdifferenzierten THP-1 eine signifikante Vitalitätsminderung bei ZrO<sub>2</sub>-Konzentrationen größer 0,002 g/l festzustellen (Abbildung 3.1.2a). Ein toxischer Einfluss der verbliebenen Essigsäure ist auszuschließen, da Kontrollen mit Essigsäure in äquivalenten Mengen durchgeführt wurden, jedoch keine Vitalitätsminderung bewirkten (ohne Abbildung).



**Abbildung 3.1.2a:** MTT-Test in differenzierten THP-1 Zellen. Vitalitätsminderung nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Konzentration an ZrO<sub>2</sub>-NPs. SEM aus n = 3; \*p < 0,05.

Ähnlich verlief der Test bei AMs, allerdings war hier bereits ab einer NP-Konzentration von 0,016 g/l keine signifikante Vitalitätsminderung mehr zu beobachten (Abbildung 3.1.2b).

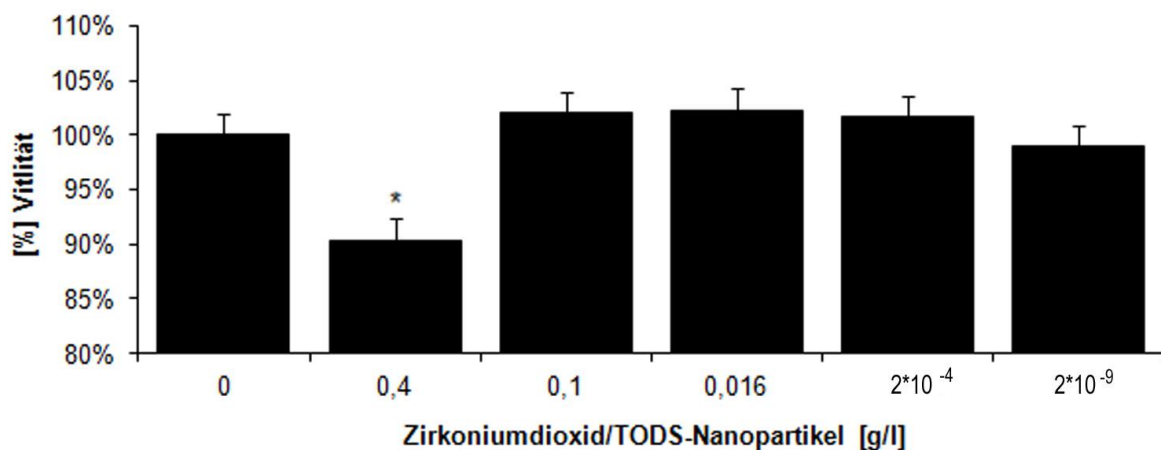


**Abbildung 3.1.2b:** MTT-Test in humanen AMs. Vitalitätsminderung nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Konzentration an  $ZrO_2$ -NPs. SEM aus  $n = 3$ ; \* $p < 0,05$ .

### 3.1.3 ZrO<sub>2</sub>/TODS-Nanopartikel

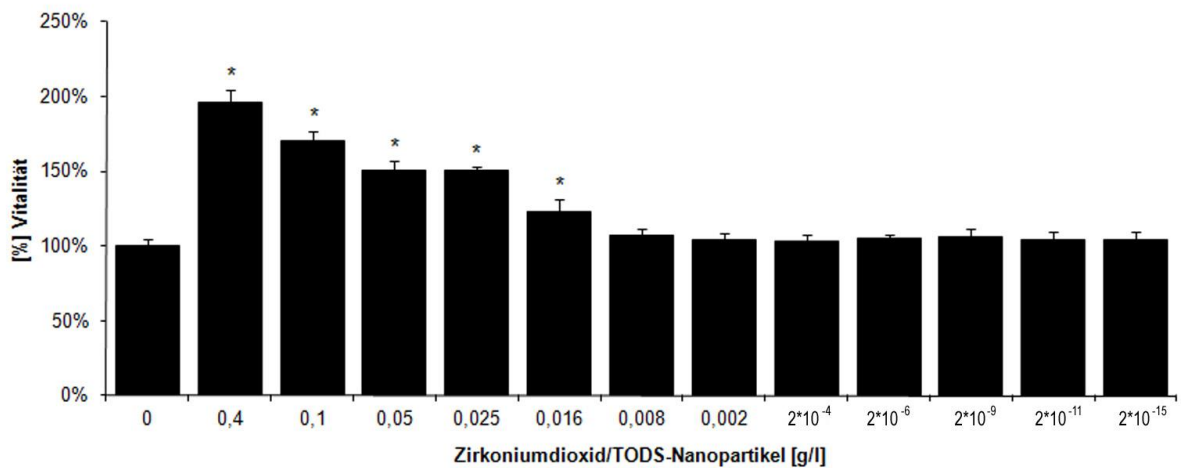
Neben den rein aus ZrO<sub>2</sub> aufgebauten Nanopartikeln wurden Core-shell-NPs eingesetzt, die neben dem ZrO<sub>2</sub>-Kern eine organisch modifizierte Ummantelung besitzen. Zunächst wurde eine Suspension dieser Art mit ZrO<sub>2</sub>/TODS-NPs (2.3.3.) untersucht. Die NP-Suspension entsprach gängigen Produkten zur industriellen Weiterverarbeitung. Die Besonderheit war hier die sehr effektive elektrosterische Stabilisierung durch die Ummantelung des ZrO<sub>2</sub>-Kerns mit 3,6,9-Trioxadecansäure. Der extrem saure pH-Wert führte jedoch zu der bereits aus den vorangegangenen MTT-Tests bekannten Fällungsreaktion bei Kontakt mit dem Kulturmedium.

Im MTT-Test mit AMs zeigten die ZrO<sub>2</sub>/TODS-NPs eine signifikant messbare Minderung der Vitalität bei einer Konzentration von 0,4 g/l (Abbildung 3.1.3a). Das Ergebnis ist in diesem Fall durchaus mit dem der unmodifizierten ZrO<sub>2</sub>-NPs vergleichbar.

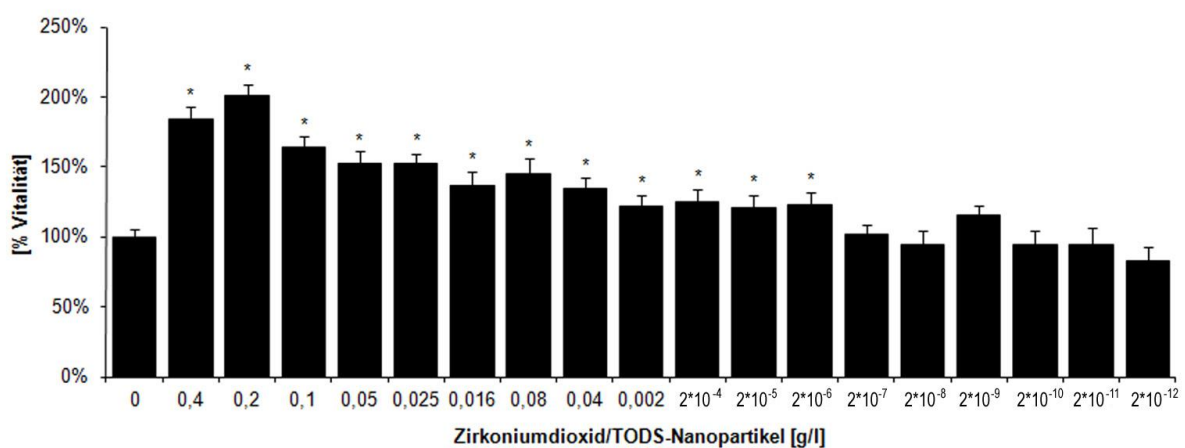


**Abbildung 3.1.3a:** MTT-Test in humanen AMs. Vitalitätsminderung nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Konzentration an ZrO<sub>2</sub>-NPs. SEM aus n = 3; \*p < 0,05.

In IMs zeigte sich jedoch ein stark unterschiedliches Ergebnis. Hier führte die Inkubation der Zellen mit  $\text{ZrO}_2/\text{TODS-NPs}$  überraschenderweise bei höheren NP-Konzentrationen zu einer vermeintlich erheblichen Vitalitätssteigerung (Abbildung 3.1.3b). Vergleichbares wurde in differenzierten THP-1 beobachtet (Abbildung 3.1.3c).



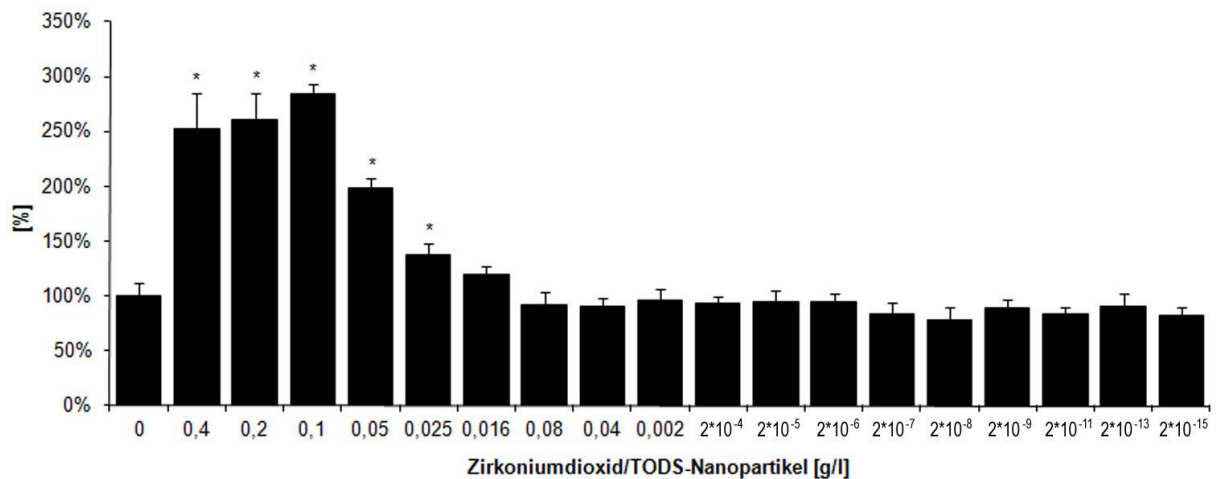
**Abbildung 3.1.3b:** MTT-Test in humanen IMs. Vitalität nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Konzentration an  $\text{ZrO}_2\text{-NPs}$ . SEM aus  $n = 2$ ;  $*p < 0,05$ .



**Abbildung 3.1.3c:** MTT-Test in differenzierten THP-1. Vitalität nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Konzentration an  $\text{ZrO}_2\text{-NPs}$ . SEM aus  $n = 3$ ;  $*p < 0,05$ .



Um zu prüfen, welchen Effekt die NPs evtl. auf die Signaldetektion des MTT-Tests ausüben, durchliefen die  $ZrO_2$ /TODS -NPs den Assay in einem weiteren Ansatz ohne Zellen (Abbildung 3.1.3d). Das daraus resultierende Profil der Messwerte indizierte somit die Beeinflussung der vergleichbaren MTT-Tests mit IMs und THP-1 in Abhängigkeit der Konzentration an  $ZrO_2$ /TODS -NPs (Abbildung 3.1.3b und Abbildung 3.1.3c). Im Gegensatz dazu konnte sich im Falle einer derartigen Inkubation von AMs dieser Effekt nicht manifestieren (Abbildung 3.1.3a).



**Abbildung 3.1.3d:** MTT-Test ohne Zellen zur Vergleichsmessung nach 24 Stunden Inkubationszeit. SEM aus  $n = 2$ ; \* $p < 0,05$ .

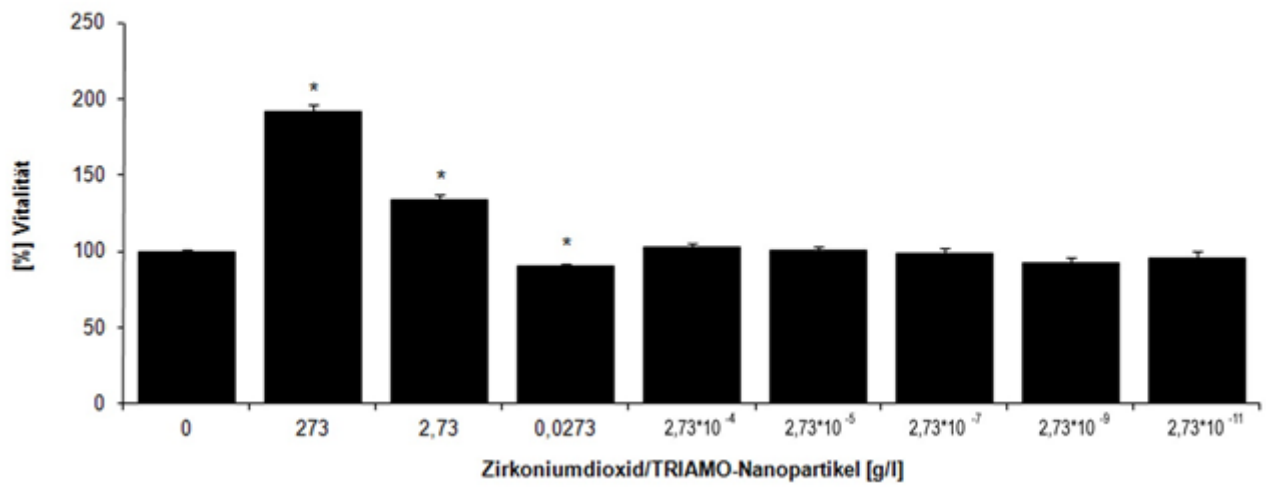
### 3.1.4 ZrO<sub>2</sub>/TRIAMO-Nanopartikel

Die in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 untersuchten NP-Suspensionen waren im sauren pH-Bereich stabilisiert und verloren bei Kontakt mit Medien, die im physiologischen pH-Bereich gepuffert sind, ihre Stabilität. Als Folge dieser Fällungsreaktion bildete sich ein Sediment aus den entstandenen Agglomeraten.

Um bei einem physiologischen pH-Wert mit nanoskaligen Partikeln arbeiten zu können, synthetisierte das INM einen speziellen Oberflächenmodifikator für die ZrO<sub>2</sub>-NPs in Form von 3-[2-(Aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilan (Kurzbezeichnung: „TRIAMO“).

Jedoch spielt generell nicht nur der pH-Wert des Dispersionsmediums eine entscheidende Rolle für das Zetapotential und damit einhergehend die Stabilität einer NP-Suspension, auch Parameter wie Additivkonzentration und Ionenstärke des Mediums stellen diesbezüglich grundlegende Kriterien dar (Wasdo et al. 2008). Selbst bei den im neutralen pH-Bereich stabilen ZrO<sub>2</sub>/TRIAMO-NPs wiegen diese Faktoren so schwer, dass beim Suspendieren in Kulturmedium eine Agglomeration zu beobachten war.

Ausgehend von den vorangegangenen MTT-Tests mit AMs war in den Versuchsreihen mit ZrO<sub>2</sub>/TRIAMO-NPs ganz entgegen der Erwartungen in hohen Konzentrationen eine Zunahme der gemessenen Absorptionswerte zu beobachten (Abbildung 3.1.4a). Bei einer ZrO<sub>2</sub>/TRIAMO-Konzentration von 0,0273 g/l konnte ein signifikanter Rückgang der Absorptionswerte verzeichnet werden (Abbildung 3.1.4a).



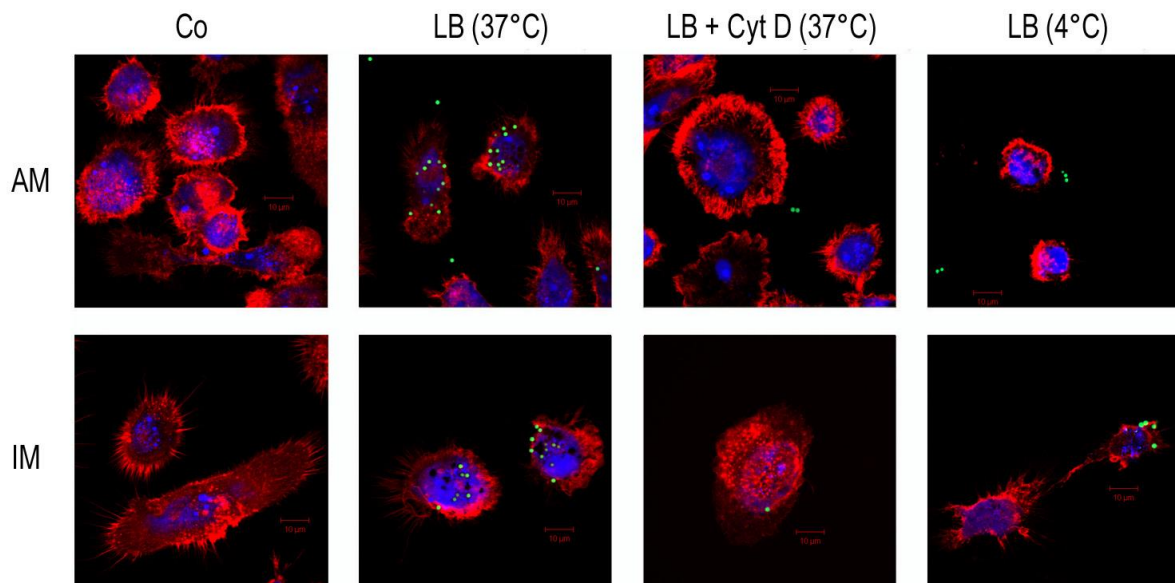
**Abbildung 3.1.4a:** MTT-Test in humanen AMs. Vitalitätsminderung nach 24 Stunden in Abhängigkeit der Konzentration an ZrO<sub>2</sub>-NPs (2.3.1). Die Messungen wurden durchgeführt mit dem Wallac-Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter, bei einer Wellenlänge von 544 nm. SEM aus n = 2; \*p < 0,05.

### 3.2 Phagozytose-Assay

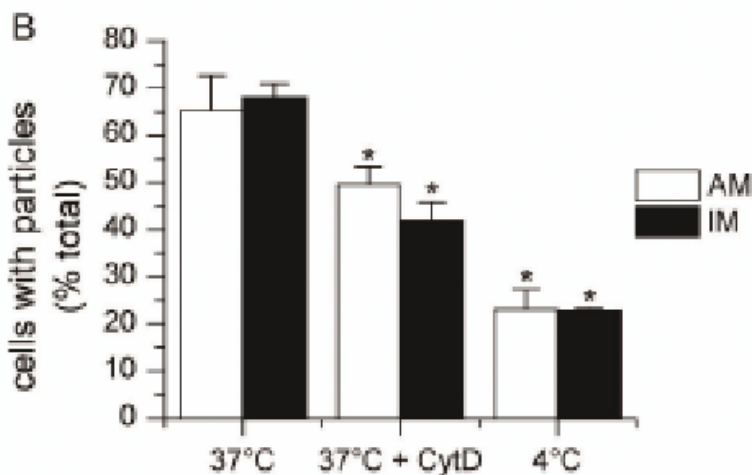
Wie in Kapitel 3.1.4 erläutert, wurde vermutet, dass AMs und IMs NPs bzw. die daraus entstandenen Agglomerate in unterschiedlichem Ausmaß aufnehmen. Um eine genauere Aussage über diese Vermutung treffen zu können, wurden AMs und IMs einem Phagozytose-Assay unterzogen. Die Charakterisierung der NPs bzw. deren z.T. mikroskaligen Agglomerate werden in Kapitel 3.3 im Detail abgehandelt.

Die CLSM-Aufnahmen (Abbildung 3.2a) zeigen die Internalisierung von FITC-markierten Latexbeads mit einem Durchmesser von 1,75  $\mu\text{m}$  bei AMs und IMs. Nach Ablauf der Inkubationszeit von vier Stunden war deutlich zu erkennen, dass der überwiegende Anteil beider Makrophagenpopulationen zahlreiche Mikrosphären internalisiert hatte. Dieser Effekt konnte bei beiden Makrophagenpopulationen durch die Präinkubation mit Cytochalasin D (10  $\mu\text{g/ml}$ ) oder alternativ bei einer Temperatur von 4° C sichtlich gemindert werden. Adäquate Untersuchungen mit alternativen Messverfahren wie der Durchflusszytometrie bestätigten die Ergebnisse dieses Phagozytose-Assays und führten zu den in Abbildung 3.2b dargestellten quantitativen Aussagen (Hoppstädter et al., 2010).

Mit dem Beobachten der Internalisierung von Partikeln einhergehend, war aufgrund der in den Kapiteln 1.2 und 1.3 geschilderten Schlüsselrolle des Aktins, die Dynamik der Aktinstrukturen im Rahmen dieser Arbeit kohärent zu untersuchen. In welchem Ausmaß die Aktin-Polymerisation von der Beschaffenheit der internalisierten NPs, bzw. deren Agglomerate abhängt wird detailliert in Kapitel 3.4 dargestellt.



**Abbildung 3.2a:** Phagozytose Aktivität. Die AMs und IMs wurden für 4 h bei 37° C mit fluoreszierenden FITC-markierten Mikrosphären (Durchmesser: 1,75  $\mu\text{m}$ ) inkubiert. Im Kontrolleexperiment wurden die Zellen für 1 h mit Cytochalasin D (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Cyt D) vorbehandelt. Alternativ fand der Versuch bei 4° C statt. Die Aufnahmen wurden durch Konfokale Laser-Rastermikroskopie am Zeiss LSM 510 Meta erstellt. F-Aktin in der Darstellung mit TRITC-Phalloidin gefärbt (rot), Zellkerne mit TOTO-3 Iodid (blau). Latexbeads sind grün dargestellt, Co zeigt unbehandelte Zellen.



**Abbildung 3.2b:** Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen. In Prozentangaben dargestellt sind die Mittelwerte der Makrophagen mit positiver Fluorosphären-assoziiierter Fluoreszenz. \*p < 0,05 im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei 37° C (Hoppstädter et al., 2010, modifiziert).

### 3.3 Charakterisierung von Nanopartikeln durch Dynamische Lichtstreuung

#### 3.3.1 ZrO<sub>2</sub>-Nanopartikel

Wie bereits in Kapitel 3.1 erläutert, können schon leichte Veränderungen der äußeren Phase von NP-Suspensionen zu Stabilitätsproblemen führen, wie z.B. Agglomeration der Primärteilchen und damit einhergehend eine Verschiebung der Partikelgrößenverteilung, häufig bis hin zur Sedimentation der eingangs stabil dispergierten, monomodalen Phase. Zur Kontrolle und Ermittlung der Größenverteilung innerhalb der dispergierten Phase im Verlauf der Untersuchungen, insbesondere unter Verwendung von physiologischen Medien oder aber dem Einwirken von physikalischen Extrembedingungen, wie beispielsweise Autoklavieren, bedient man sich dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung *via* Partikelgrößenanalytoren (Kapitel 2.7). Abbildung 3.3.1a zeigt die Partikelgrößenverteilung am Beispiel der in Kapitel 2.3.1 vorgestellten NP-Suspension. Das INM-Produkt mit 40 % Feststoffanteil in Form von sphärischen ZrO<sub>2</sub>-NPs musste vor der DLS-Messung auf einen Feststoffgehalt verdünnt werden, der sich für die Messung am MICROTRAC UPA 150 (Microtrac Inc.) eignet.

Die Zielkonzentration des ZrO<sub>2</sub> lag bei 0,4 % (m/V) und wurde durch Verdünnung mit destilliertem Wasser erlangt. Die Messergebnisse bestätigen eine nach wie vor stabile NP-Suspension mit einem d<sub>90</sub>-Wert von ca. 29 nm. D.h. der hydrodynamischen Partikeldurchmesser bei 90 % aller gemessenen Teilchen überstieg nicht den Wert von ca. 29 nm und deckte sich somit mit den Angaben über die Partikelgröße von ca. 30 nm in der 40%igen Ausgangssuspension kurz nach der Synthese. Eine Behandlung dieser 0,4%igen Suspension mittels Autoklav führte zu keinerlei wesentlichen Veränderungen der hydrodynamischen Partikeldurchmesser (Abbildung 3.3.1b). Erst nach Neutralisation des sauren Dispersionsmittels mit 0,1 M Natronlauge und der daraus folgenden Ausfällung der Partikelagglomerate, ergab sich ein polydisperses Profil für die Partikelcharakterisierung mit einem d<sub>90</sub>-Wert der für den Überstand bei über 4,2 µm lag (Abbildung 3.3.1c). Die Partikelcharakterisierung nach dem Mischen des neutralisierten Überstandes zu gleichen Teilen mit Kulturmedium zeigte ein polydisperses Profil mit einem d<sub>90</sub>-Wert von über 5,7 µm (Abbildung 3.3.1d).

Repräsentative Partikelgrößenverteilung einer  $ZrO_2$ -Suspension (3.3.1)  
Messung der DLS mittels Microtrac UPA 150, Microtrac Inc.

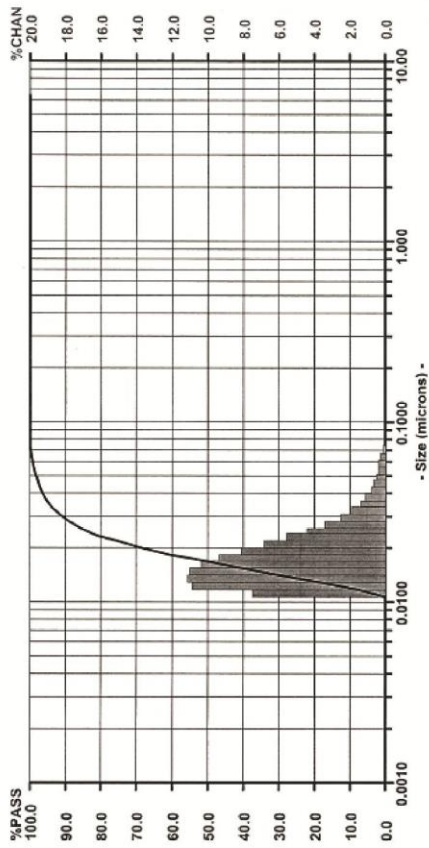


Abbildung 3.3.1a: 0,4 %ige  $ZrO_2$ -Suspension (2.3.1).  $d_{90} = 28,6$  nm.

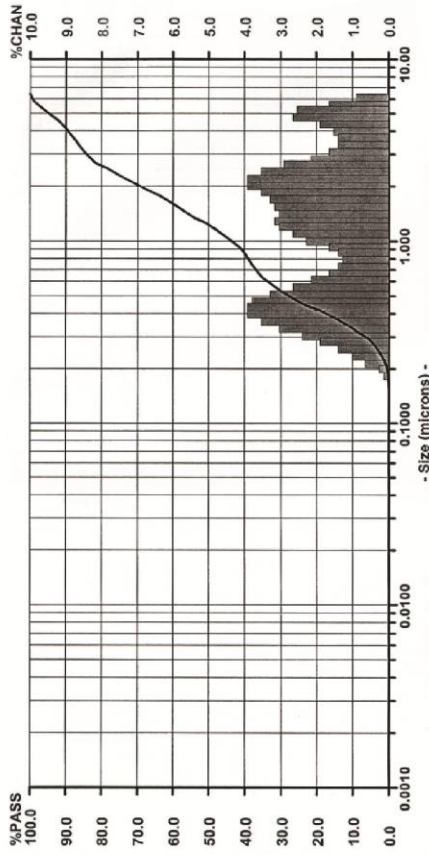


Abbildung 3.3.1c: Überstand einer neutralisierten 40 %igen  $ZrO_2$ -Suspension (2.3.1).  $d_{90} = 4,206$   $\mu m$ .

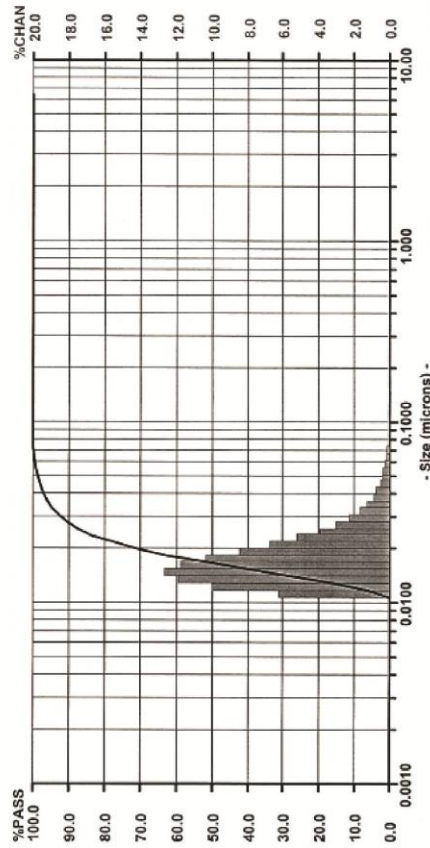


Abbildung 3.3.1b: 0,4 %ige  $ZrO_2$ -Suspension (2.3.1) nach dem Autoklavieren.  $d_{90} = 27,3$  nm.

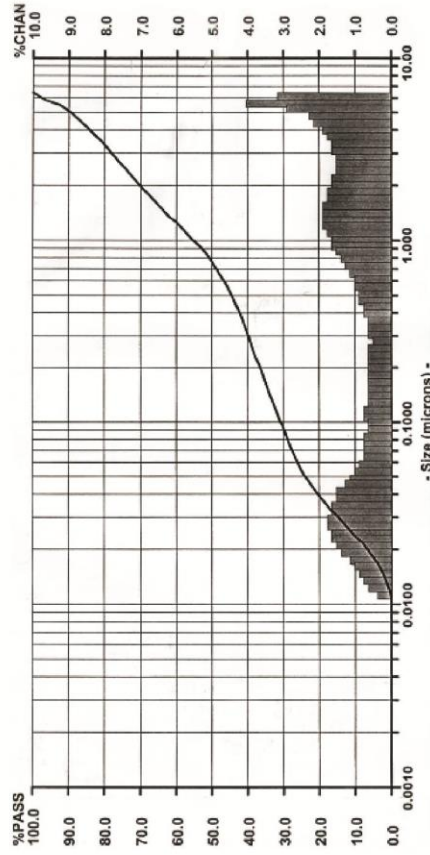


Abbildung 3.3.1d: Überstand einer neutralisierten 40 %igen  $ZrO_2$ -Suspension (2.3.1) gemischt zu gleichen Teilen mit Kulturmedium (2.1.3).  $d_{90} = 5,793$   $\mu m$ .

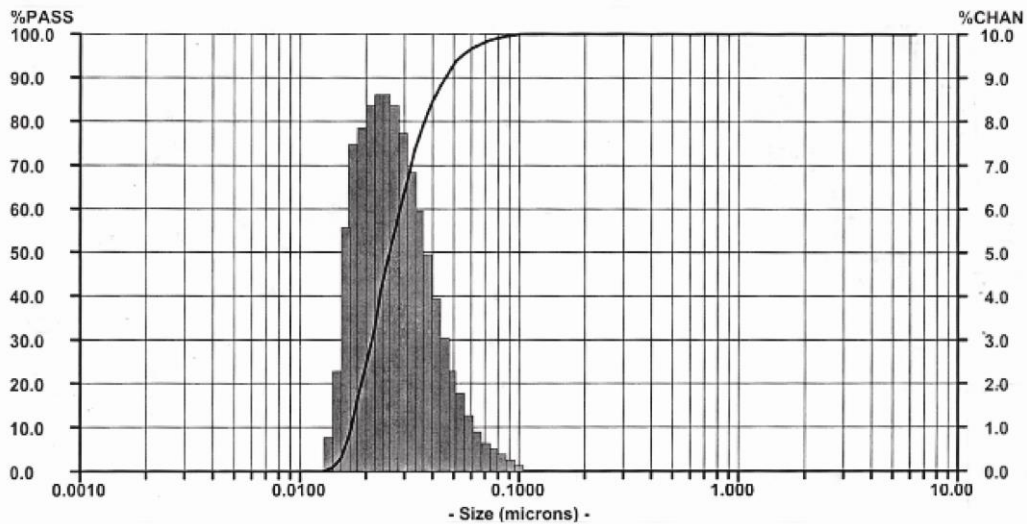
### 3.3.2 ZrO<sub>2</sub> /TRIAMO-Nanopartikel

Um den in Kapitel 3.3.1 gezeigten Stabilitätsproblemen des ZrO<sub>2</sub>-Kolloids beim Arbeiten im neutralen pH-Bereich entgegen zu wirken, synthetisierte das INM Saarbrücken oberflächenmodifizierte elektrosterisch stabilisierte ZrO<sub>2</sub>/TRIAMO-Nanopartikel (Kapitel 2.3.2). Die mit einem d90-Wert von ca. 48 nm angegebenen Partikel zeigten nach dem Autoklavieren weiterhin monomodalen Charakter und lagen bei einem d90-Wert von ca. 45 nm (Abbildung 3.3.2a).

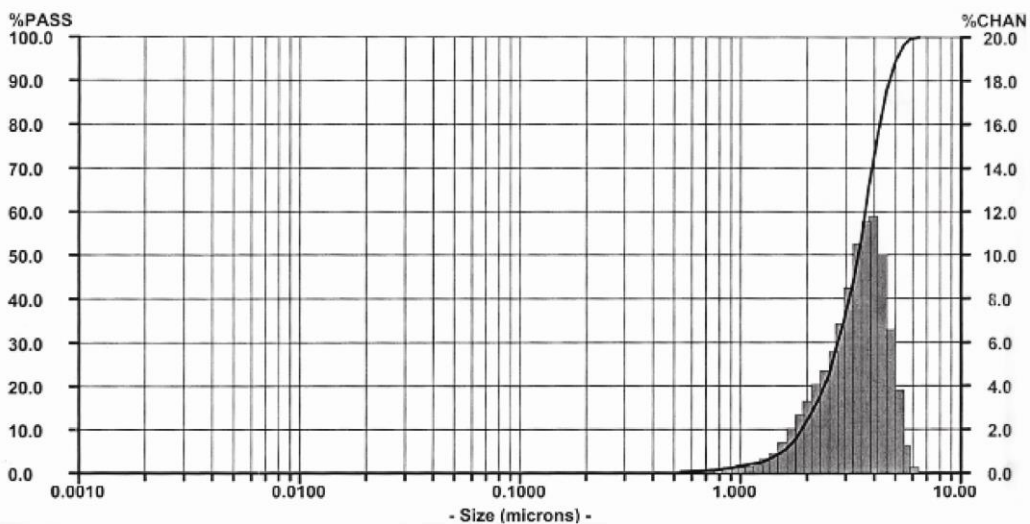
Trotz des vom neutralen pH-Wert weit entfernten Isoelektrischen Punktes (IEP) und der sterischen Stabilisierung der ZrO<sub>2</sub>-Kerne mittels kovalenter Bindung an den Oberflächenmodifikator TRIAMO reichten diese Faktoren nicht aus, um der hohen Ionenstärke und den zahlreichen adhären Proteinen des Zellkulturmediums entgegen zu wirken (Wasdo et al. 2008). Als Folge verschiebt sich hier die gesamte Partikelgrößenverteilung ebenfalls in den Mikrometerbereich (Abbildung 3.3.2b).



**Repräsentative Partikelgrößenverteilung einer  $ZrO_2$ /TRIAMO-Suspension (3.3.2)  
Messung der DLS mittels Microtrac UPA 150, Microtrac Inc.**



**Abbildung 3.3.2a:** 0,4 %ige  $ZrO_2$ /TRIAMO-Suspension (2.3.2) nach dem Autoklavieren.  $d_{90} = 45,1$  nm.



**Abbildung 3.3.2b:** 0,4 %ige  $ZrO_2$ /TRIAMO-Suspension (2.3.2) in Kulturmedium. Ausgangssuspension autoklaviert.  $d_{90} = 473,9$  nm.

### 3.3.3 ZrO<sub>2</sub>/TODS Nanopartikel

In Abbildung 3.6.3a ist die Partikelgrößenbestimmung der 0,4%igen wässrigen Verdünnung einer Nanosuspension mit ZrO<sub>2</sub>/TODS Nanopartikel gezeigt. Die zunächst monomodale Suspension mit einem d90-Wert von 38 nm (Abbildung 3.3.3a) ergab nach dem Autoklavieren eine polydisperse Verteilung mit einem d90-Wert von ca. 33 nm (Abbildung 3.3.3b).

Beim Versuch, die Nanosuspension mit Kulturmedium zu mischen, war eine sofortige Agglomeration erkennbar, wie sie bereits bei den vorangegangenen Nanosuspensionen geschildert wurde. Für die weiteren Untersuchungen sollten daher synthetische Partikel verwendet werden, die zum einen in Kulturmedium bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 nach wie vor nanoskalig vorliegen, zum anderen spezifisch nachweisbar und präzise vor, während und nach der Aufnahme in Zellen z.B. mittels Konfokaler Laser-Raster Mikroskopie lokalisierbar sind. Folglich wurden die Untersuchungen mit den un-/modifizierten ZrO<sub>2</sub>-Kolloiden nicht weiter verfolgt.

Repräsentative Partikelgrößenverteilung einer  $ZrO_2$ /TODS-Suspension (3.3.3)  
Messung der DLS mittels Microtrac UPA 150, Microtrac Inc.

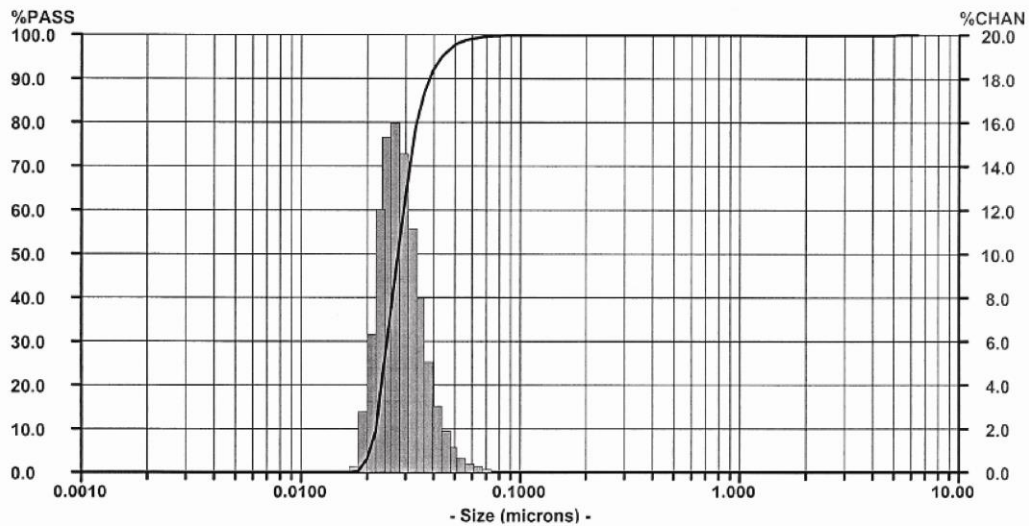


Abbildung 3.3.3a: 0,4 %ige  $ZrO_2$ /TODS-Suspension (2.3.3).  $d_{90} = 38$  nm.

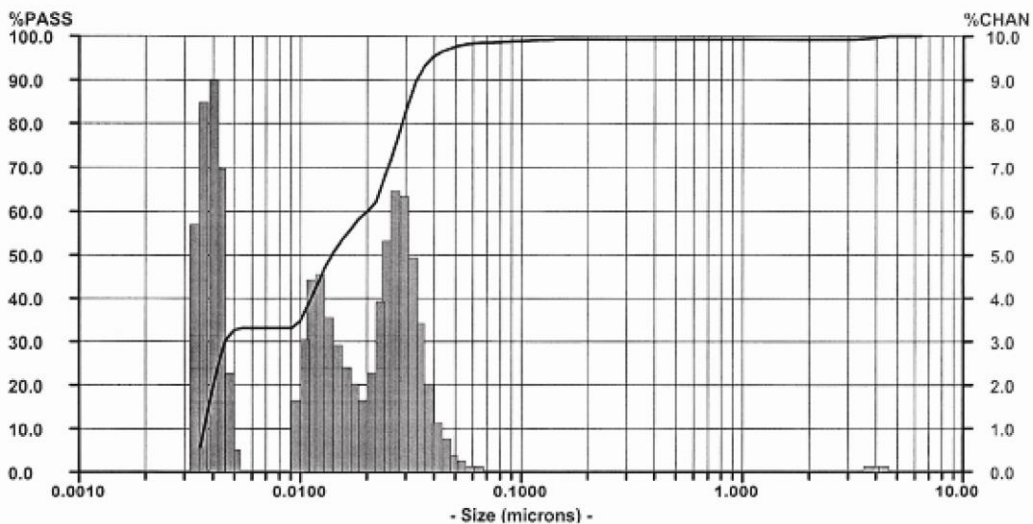


Abbildung 3.3.3b: 0,4 %ige  $ZrO_2$ /TODS-Suspension (2.3.3) nach dem Autoklavieren.  $d_{90} = 33,4$  nm.

### **3.3.4 Fluoreszenzmarkierte Silika-Nanopartikel**

#### **3.3.4.1 Allgemein**

Die im Folgenden analysierten Nanopartikel eignen sich durch die während der Partikelsynthese in die Matrix eingebundenen speziellen Fluoreszenzfarbstoffe insbesondere für Messungen am Konfokalen Laser-Raster Mikroskop (Kapitel 3.6) nicht nur vor, sondern ggf. während oder nach der Aufnahme in die Zelle. Anders als bei den technisch genutzten NPs (z.B. Kapitel 2.3.1 und 2.3.3) sollte mit diesen fluoreszenzmarkierten Silika-Nanopartikeln der Einfluss nanoskaliger Strukturen auf lebende Zellen untersucht werden.

Die Konzentration der mit dieser Methode zu charakterisierenden PBio.S Kolloide betrug stets ca. 0,1 %. Den Untersuchungen zur Partikelgrößenanalyse ging jeweils eine zehninminütige Präinkubation der verdünnten Nanosuspensionen im Ultraschallbad (Branson Ultrasonic Deamer B42, 240 Watt, 50 HZ) voraus.

#### **3.3.4.2 PBio.S4 und PBio.S4.PICS750**

Das Messen der DLS von den mit ATTO 590 NHS-ester markierten PBio.S4 Silika-Partikeln im wässrigen Milieu ergab eine recht schmale monomodale Verteilung (Abbildung 3.3.4.2a). Angestrebt wurde bei allen aufgeführten PBio.S-Kolloiden ein Partikeldurchmesser von ca. 100 nm, einerseits um noch der Definition von Nanopartikeln (Kapitel 1.1.1) gerecht zu werden, andererseits um möglichst nahe an der maximalen Auflösungsgrenze der verwendeten Mikroskope zu bleiben.

Beim Dispergieren in Kulturmedium blieb der monomodale Charakter zwar erhalten, allerdings fand eine Rechtsverschiebung mit einer breiteren Streuung des hydrodynamischen Durchmessers statt (Abbildung 3.3.4.2b).

Betrachtet man im Vergleich zu den beiden letzteren Abbildungen die Ergebnisse der nach Kapitel 2.3.4.3 oberflächenmodifizierten Partikelvarianten in Abbildung 3.3.4.2c

und 3.3.4.2d, lässt sich daraus der erzielte Vorteil einer durch derartige Oberflächenmodifikation bedingten sterischen Stabilisierung erkennen.

Durch diese zusätzliche Stabilisierung ließ sich trotz der erhöhten Ionenstärke im Kulturmedium ein Agglomerieren der Primärteilchen verhindern, was vergleichsweise bei den unmodifizierten Kolloiden nicht der Fall war (Abbildung 3.3.4.2b).

Repräsentative Partikelgrößenverteilung von ATTO 590 NHS-ester markierten Silika-Partikeln mit und ohne Oberflächenmodifikation als jeweils 0,1 %ige Suspension - Messung der DLS mittels Nanotracs Particle Size Analyser NPA 250 (Microtrac Inc.)

PBio.S4 in H<sub>2</sub>O

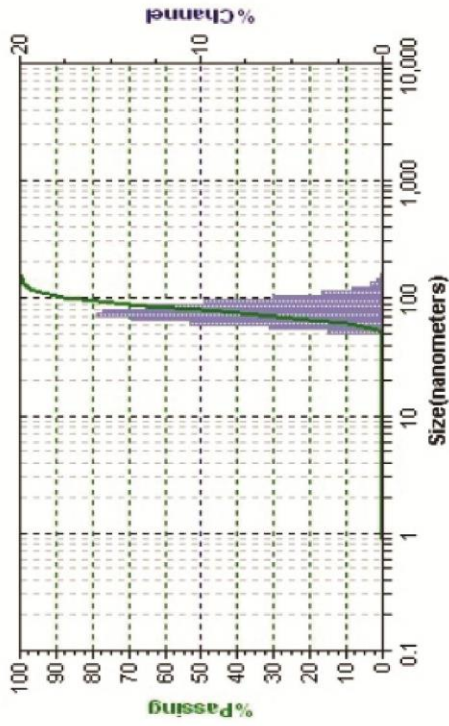


Abbildung 3.3.4.2a: d90 = 105 nm

PBio.S4 PICS750 in H<sub>2</sub>O

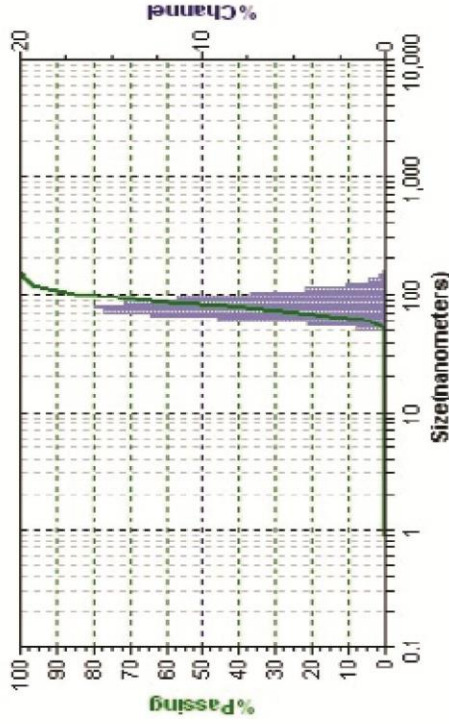


Abbildung 3.3.4.2c: d90 = 108,3 nm

PBio.S4 in Kulturmedium

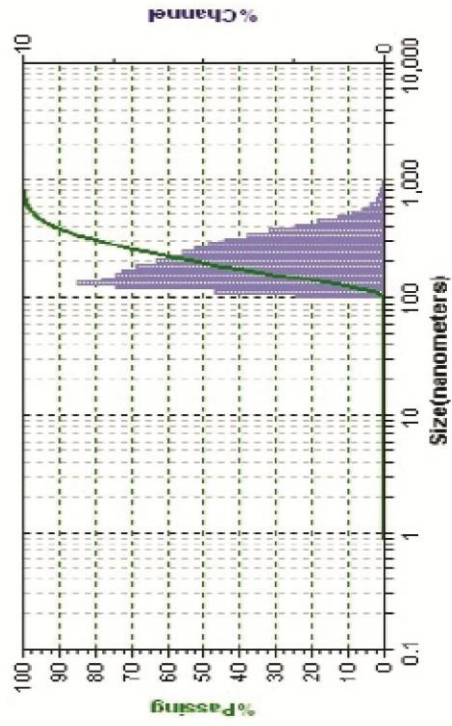


Abbildung 3.3.4.2b: d90 = 388 nm

PBio.S4 PICS750 in Kulturmedium

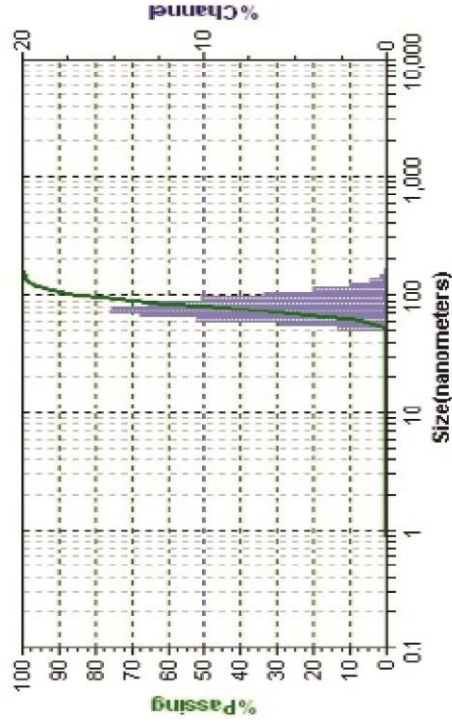


Abbildung 3.3.4.2d: d90 = 107,1 nm

### 3.3.4.3 PBio.S5 und PBio.S5.PICS750

Sowohl die nicht mit PICS750 modifizierten als auch die damit modifizierten (mit ATTO 647 NHS-ester markierten) PBio.S5-Kolloide ähnelten den korrelierenden Varianten der PBio.S4-Kolloide bis auf die eingearbeiteten unterschiedlichen ATTO<sup>®</sup>-Fluoreszenzfarbstoffe und den geringfügig anderen hydrodynamischen Durchmesser der PBio.S5/.PICS750 weitestgehend. Deshalb ist es nicht überraschend, dass auch die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung durchaus miteinander vergleichbar sind. Auch hier waren stets monomodale Partikelverteilungen zu messen (Abbildung 3.3.4.3a bis 3.3.4.3d).

Ähnlich wie in Abbildung 3.3.4.2b dargestellt, kam es auch bei PBio.S5 in Kulturmedium zu einer Rechtsverschiebung und somit zur breiteren Verteilung der Partikelfraktionen (Abbildung 3.3.4.3b.). Es handelte sich hierbei jedoch um ein geringeres Ausmaß.

Da sich viele Untersuchungen über einen erweiterten Zeitraum hinziehen konnten, war es notwendig, zuverlässige Aussagen bzgl. der Stabilität der zu untersuchenden Nanosuspensionen in Abhängigkeit der Zeit treffen zu können. Die in diesem Kapitel aufgeführten Nanosuspensionen PBio.S5/.PICS750 sollten demnach exemplarisch für die Kolloide in Kapitel 3.3.4 24 Stunden nach der ersten Messung noch einmal charakterisiert werden. Nach 24-stündiger Lagerung bei RT waren im Vergleich zu den Messungen am Vortag keinerlei auffällige Veränderungen zu beobachten. Das Resultat spricht vor allem für die Verwendung der mit PICS750 oberflächenmodifizierten Nanopartikel.



Repräsentative Partikelgrößenverteilung von ATTO 647 NHS-ester markierten Silika-Partikeln mit und ohne Oberflächenmodifikation als jeweils 0,1 %ige Suspension - Messung der DLS mittels NanoTrac Particle Size Analyser NPA 250 (Microtrac Inc.)

PBio.S5 in H<sub>2</sub>O

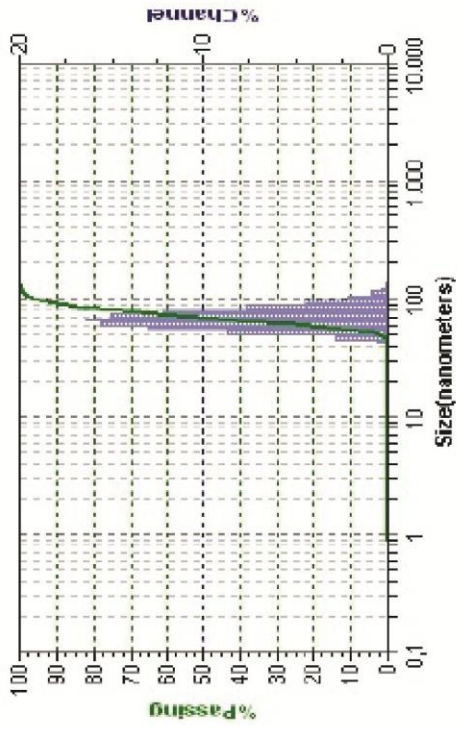


Abbildung 3.3.4.3a: d90 = 91,2 nm

PBio.S5 PICS750 in H<sub>2</sub>O

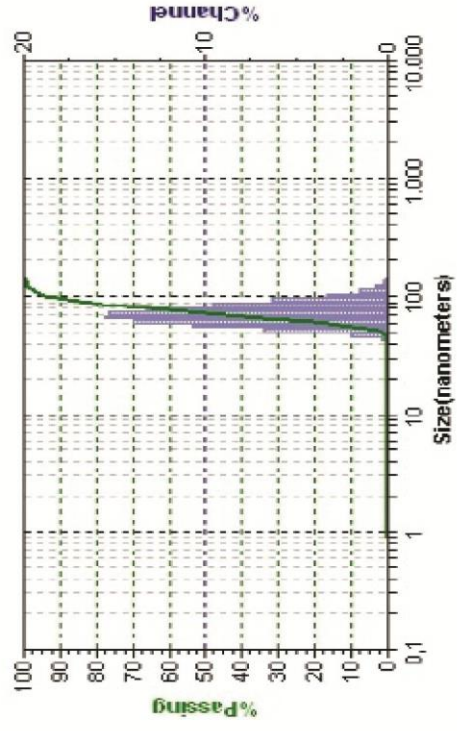


Abbildung 3.3.4.3c: d90 = 96,4 nm

PBio.S5 in Kulturmedium

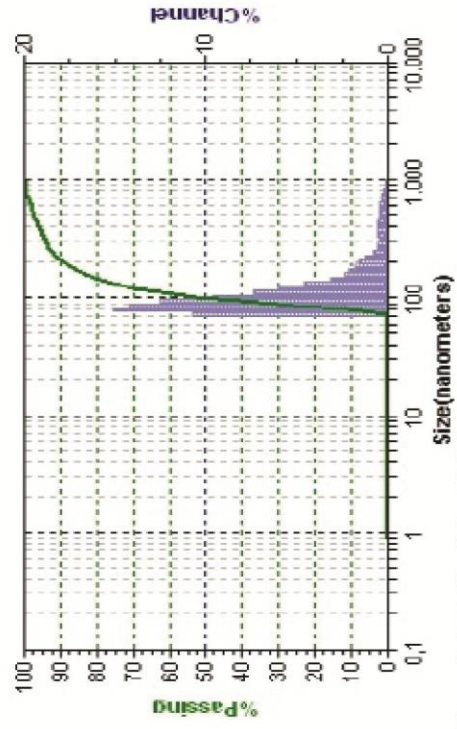


Abbildung 3.3.4.3b: d90 = 208,4. nm

PBio.S5 PICS750 in Kulturmedium

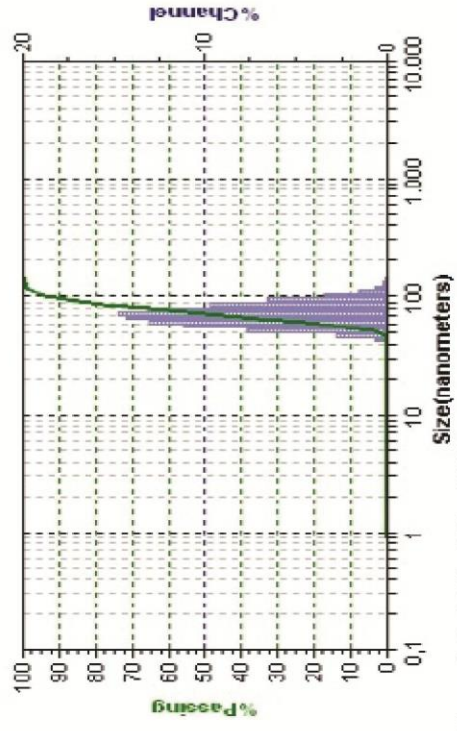


Abbildung 3.3.4.3d: d90 = 96,6 nm

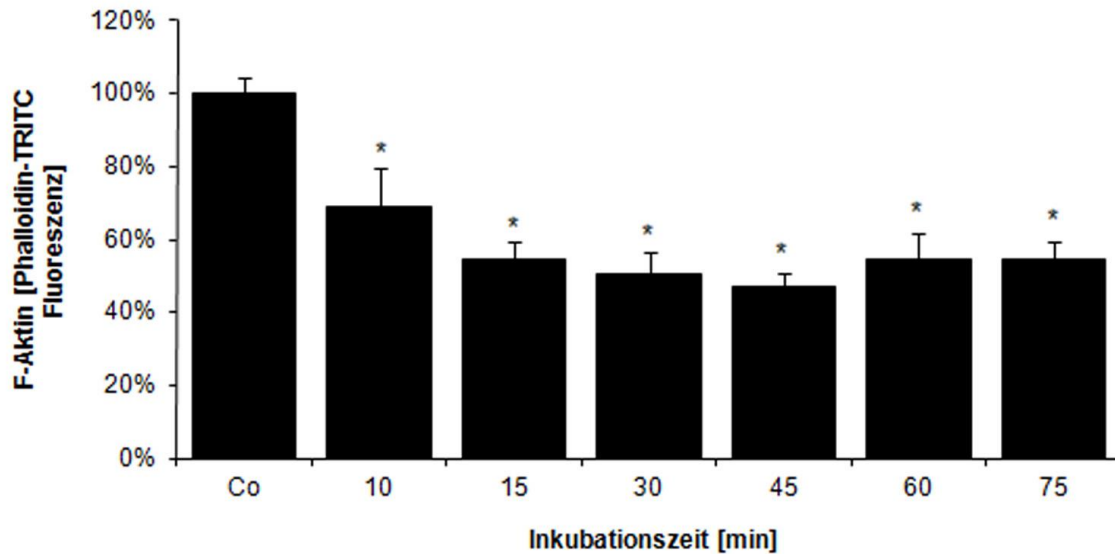


### 3.4 Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin

Anhand dieses spezifischen Fluoreszenzassays sollte die Beeinflussung extrazellulärer Stimuli in Form von unterschiedlichen Nanopartikeln auf das dynamische Gleichgewicht des intrazellulär vorkommenden  $\beta$ -Aktins quantitativ bestimmt werden (Kapitel 1.3 und 2.6).

Jasplakinolide ist ein natürlich vorkommendes zyklisches Peptid und stammt aus dem Meeresschwamm *Jaspis johnstoni*. Es besteht aus drei Aminosäuren, ist nicht fluoreszierend, induziert die Aktin-Polymerisation sowie dessen Stabilisierung und bindet kompetitiv mit Phallotoxinen an fibrilläres Aktin (Crews et al., 1986, Bubb et al., 1994, Molecular Probes Product Information MP 07473, 1994). Die besondere Eigenschaft des Jasplakinolides, kompetitiv mit Phallotoxinen an F-Aktin zu binden, sollte dazu beitragen, die in Kapitel 2.6.3 geschilderte Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin zu validieren, bevor stattdessen der Einfluss von NPs untersucht wurde.

Abbildung 3.4a zeigt die Fluoreszenzminderung als Resultat der kompetitiven Bindung am F-Aktin und somit den verminderten Gehalt des nachweisbaren Phalloidin-TRITC in den präparierten Zellen bei vorheriger Inkubation mit Jasplakinolide (siehe auch Bubb et al., 1994).

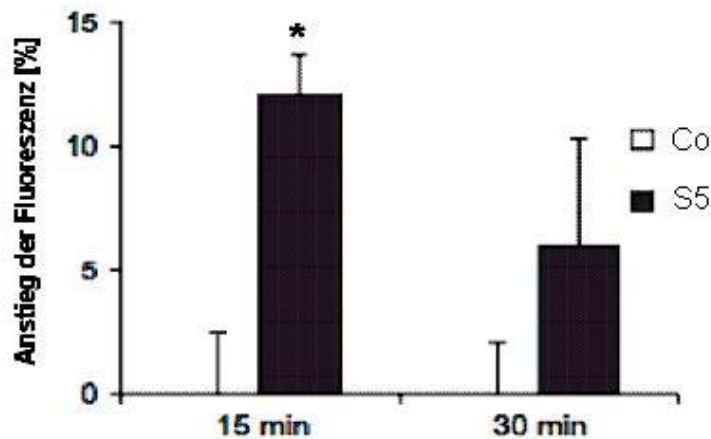


**Abbildung 3.4a:** Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin in PMA-differenzierten THP-1. Die Zellen wurden mit Jasplakinolide-haltigem Kulturmedium (1  $\mu$ M) für die angegebene Dauer inkubiert. Im Anschluss wurde F-Aktin quantifiziert. SEM aus  $n = 3$ ; \* $p \leq 0,05$ . Co = unbehandelte Zellen.

Um den Einfluss von synthetischen NPs auf den intrazellulären Gehalt fibrillären Aktins mit der in Kapitel 2.6 geschilderten Methode untersuchen zu können, wurde zunächst Kulturmedium mit Silika-NPs (Kapitel 2.3.4.2 bis 2.3.4.3) angereichert. Die Monomodalität der im Kulturmedium suspendierten NPs wurde durch eine zehnmünütige Behandlung im Ultraschallbad (Branson Ultrasonic Deaner B42, 240 Watt, 50 HZ) erlangt, bevor die in Kapitel 2.6.3 geschilderte Versuchsdurchführung vollzogen wurde.

Die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten, PEGylierten und nicht-PEGylierten Silika-NPs wurden jeweils in einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l für 15, 30 oder 60 Minuten mit differenzierten THP-1 inkubiert. In Zellen die mit ATTO 647 NHS-Ester markierten NPs (PBio.S5 und PBio.S5.PICS750) inkubiert wurden, ließen sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen, nach 15 und 30 Minuten jeweils erhöhte Fluoreszenzwerte messen. Insbesondere im Fall der THP-1 die mit den PEGylierten PBio.S5.PICS750 NPs inkubiert wurden, konnte nach 15 und 30 Minuten Inkubationsdauer eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzwerte gemessen werden (Abbildung 3.4b).

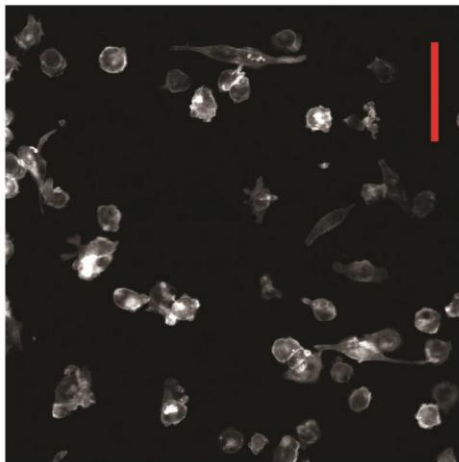
Die alternative Versuchsdurchführung mit ATTO 590 NHS-ester markierten Silika-NPs (PBio.S4 und PBio.S4.PICS750) ergab hingegen während der Inkubationsdauer überwiegend einen signifikanten Fluoreszenzrückgang.



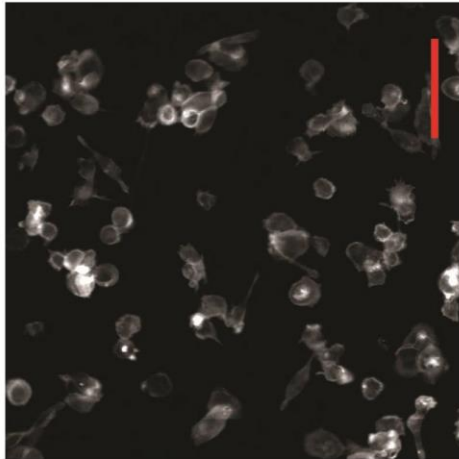
**Abbildung 3.4b:** Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin in PMA-differenzierten THP-1. Die Zellen wurden mit NPs in Kulturmedium für die angegebene Dauer inkubiert. Im Anschluss wurde F-Aktin quantifiziert. SEM aus  $n = 2$ . S5 = **PBio.S5.PICS750**, Co = **unbehandelte Zellen**.

Präparationen die mit PBio.S4 NPs durchgeführt wurden und am Wallac-Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter fluorometrisch vermessen wurden, waren leider nicht aussagekräftig. Aufnahmen mit dem automatischen Mikroskop BD Pathway 855 (BD Biosciences, Kalifornien, USA) zeigten, dass nicht-PEGylierte Silika-NPs im Gegensatz zu den PEGylierten von den Zellen stärker aufgenommen wurden (Abbildung 3.4c).

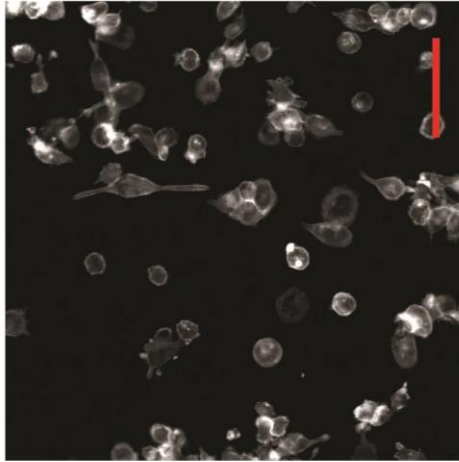
## 3.4c Mikroskopische Untersuchung von Silika-NPs mit differenzierten THP-1



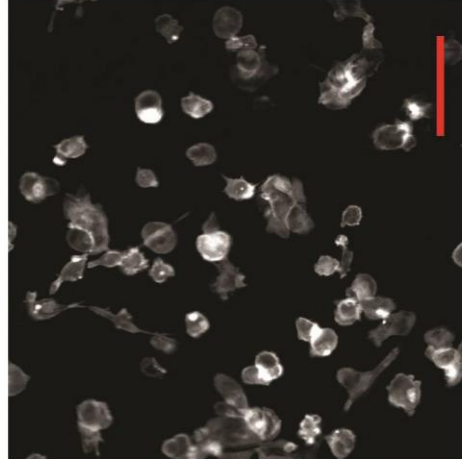
3.4c1: Co



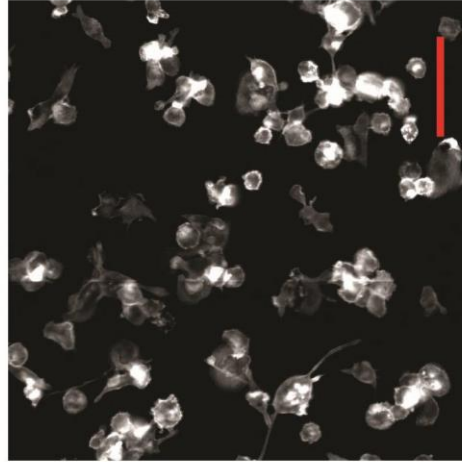
3.4c2: Nicht-PEGylierte NPs (PBio.S4)



3.4c4: PEGylierte NPs (PBio.S4.PICS750)



3.4c3: Nicht-PEGylierte NPs (PBio.S5)

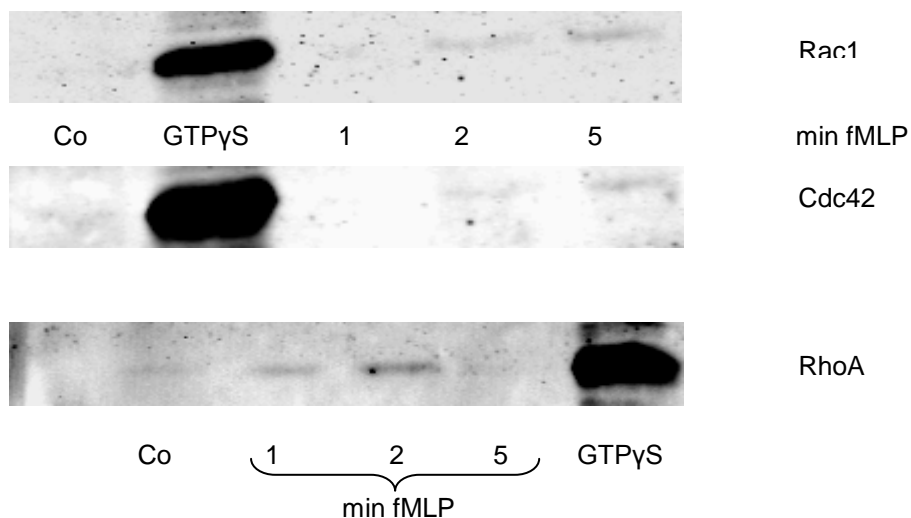


3.4c5: PEGylierte NPs (PBio.S5.PICS750)

**Abbildung 3.4c:** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Silika-NPs mit differenzierten THP-1. Markiert wurde F-Aktin mit Phalloidin-TRITC. 3.4c1: Co = Kontrollzellen ohne NP-Inkubation; 3.4c2 + 3.4c3: Inkubation mit nicht-PEGylierten NPs; 3.4c4 + 3.4c5: Inkubation mit PEGylierten NPs. Inkubationszeit mit NPs betrug 30 Minuten.  $\mu$ -Balken (rot) entspricht 100  $\mu$ m. Aufnahmen wurden mit dem BD Pathway 855 erstellt

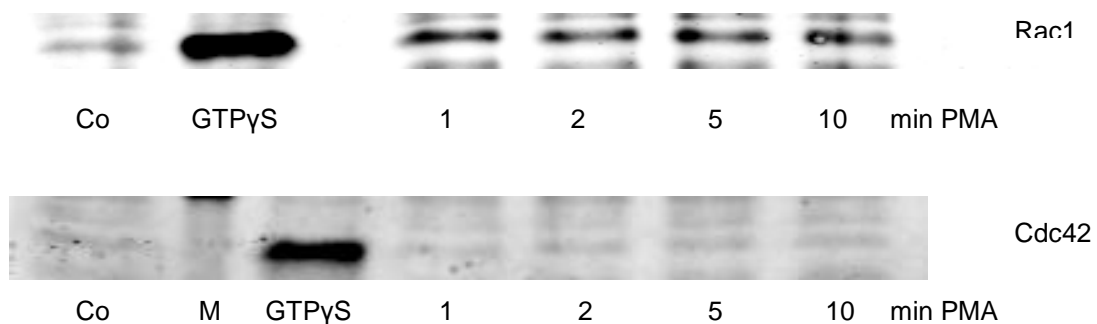
### 3.5 Rho-GTPasen *Pulldown Assay*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand des Affinitätspräzipitationstests untersucht werden, ob die zu untersuchenden Silika-NPs eine Aktivierung von Rho-GTPasen hervorrufen können. Zum Nachweis über die Validität des Assays sind zunächst in den Abbildungen 3.5a und 3.5b Ergebnisse von Pulldown Assays aufgeführt, die mit den adäquaten Aktivatoren fMLP (fMet-Leu-Phe) und PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Benard et al., 1999, Chen et al., 2004) an ausdifferenzierten THP-1 getestet wurden. Die Inkubation mit fMLP-haltigem Kulturmedium erfolgte über unterschiedliche Zeiträume bei 37° C im Brutschrank. Bei Rac1 und Cdc42 war eine leichte Aktivierung nach zwei und fünf Minuten Inkubationsdauer festzustellen. RhoA lag insbesondere nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten im aktivierten Zustand vor (Abbildung 3.5a).



**Abbildung 3.5a:** Aktivierung der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA in ausdifferenzierten THP-1 nach Stimulation mit fMLP (100 nM). Als Negativkontrolle (Co) diente ein Ansatz mit unbehandelten Zellen. Pro Ansatz wurden 400  $\mu$ g Protein verwendet. (Repräsentatives Ergebnis).

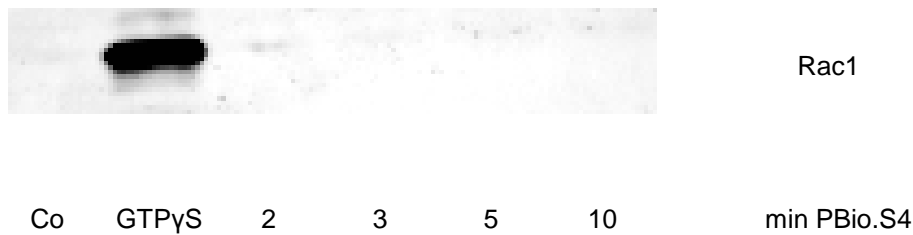
Die Inkubation mit PMA-haltigem Kulturmedium erfolgte wie bei der Behandlung mit fMLP über unterschiedliche Zeiträume bei 37° C im Brutschrank. Beim Pulldown Assay für Rac1 war eine deutliche Aktivierung von Rac1 erkennbar. Cdc42 zeigte dagegen nur geringe Basisaktivierung und nahezu keine Aktivierung durch PMA. Als weitere Positivkontrolle fand ein GTPγS induzierter Austausch von Rac/Cdc-GDP zu Rac/Cdc-GTP statt.



**Abbildung 3.5b:** Aktivierung von Rac1 und Cdc42 in ausdifferenzierten THP-1 nach Stimulation mit PMA (100 nM). Co = Negativkontrolle. M = **PageRuler™ Prestained Protein Ladder #0671 (Fermentas, St.Leon- Rot, Germany)**. Im Falle des Rac1-Pulldowns konnte mit einer Proteinmenge von 200 µg gearbeitet werden. Beim Pulldown für Cdc42 wurden mit Ausnahme der GTPγS-Positivkontrolle die Ansätze jeweils auf 400 µg Proteinanteil erhöht. (Repräsentatives Ergebnis).

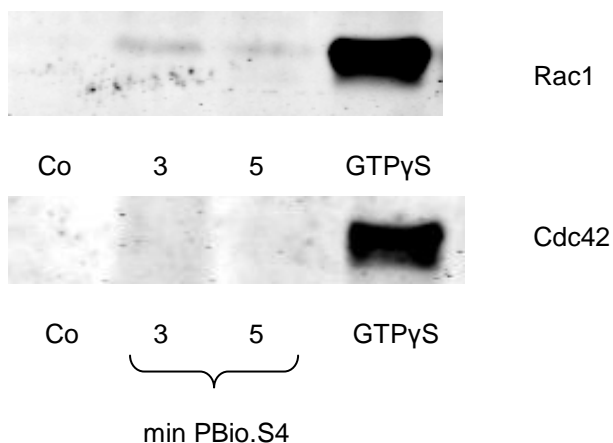
Die Affinitätspräzipitationstests zur Untersuchung auf Aktivierung der Rho-GTPasen durch NPs erfolgten an isolierten humanen AMs mit „PEGylierten“ und „unPEGylierten“ ATTO 590 NHS-ester markierten Silika-NPs. Die in Kulturmedium verdünnten NPs wurden zunächst einer zehninütigen Behandlung im Ultraschallbad (Branson Ultrasonic Deaner B42) bei 240 Watt und 50 HZ unterzogen, bevor die Inkubation für die jeweils angegebene Dauer mit den Zellen im Brutschrank bei 37° C stattfand.

Untersuchungen der PBD bindenden GTPasen Rac1 und Cdc42 in humanen AMs zeigten in einer Konzentration von 5 ng/µl keine messbare Basisaktivierung und auch keine messbare Aktivierung nach Inkubation mit PBioS4 NPs über einen Zeitraum von zwei bis zehn Minuten (Für Rac1 in Abbildung 3.5c dargestellt; für Cdc42 nicht gezeigt).



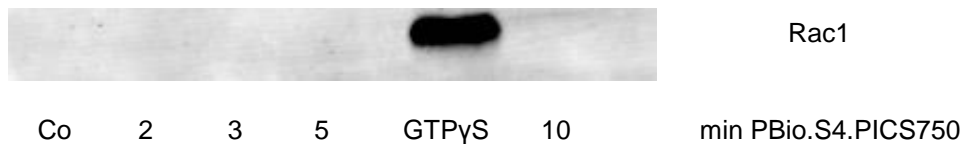
**Abbildung 3.5c:** Pull-down Assay für Rac1 in humanen AMs. Inkubation mit PBioS4 (5 ng/ $\mu$ l) in Kulturmedium erfolgte über unterschiedliche Zeiträume bei 37° C im Brutschrank. Als Negativkontrolle (Co) diente ein Ansatz mit unbehandelten Zellen. Positivkontrolle: GTP $\gamma$ S induzierter Austausch von Rac/Cdc-GDP zu Rac/Cdc-GTP. Pro Ansatz wurden 200  $\mu$ g Protein verwendet. (Repräsentatives Ergebnis).

Erst nach Erhöhung der NP-Konzentration auf 50 ng/ $\mu$ l konnte eine durch Inkubation mit PBio.S4 NPs hervorgerufene Aktivierung zwar für Rac1 jedoch nicht für Cdc42 mit dem Pull-down Assay nachgewiesen werden (Abbildung 3.5d).



**Abbildung 3.5d:** Pull-down Assay für Rac1 und Cdc42 in humanen AMs. Inkubation mit PBioS4 (50 ng/ $\mu$ l) in Kulturmedium erfolgte über unterschiedliche Zeiträume bei 37° C im Brutschrank. Als Negativkontrolle (Co) diente ein Ansatz mit unbehandelten Zellen. Positivkontrolle: GTP $\gamma$ S induzierter Austausch von Rac/Cdc-GDP zu Rac/Cdc-GTP. Pro Ansatz wurden mit Ausnahme von der Positivkontrolle 400 statt 200  $\mu$ g Protein verwendet. (Repräsentatives Ergebnis).

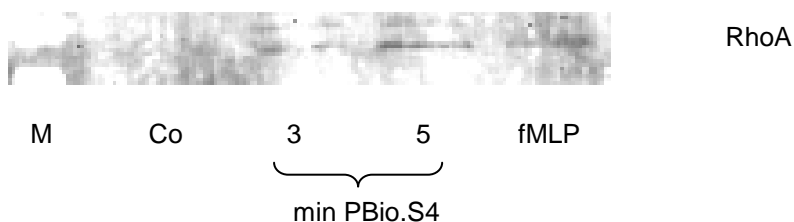
Die oberflächenmodifizierten PBio.S4.PICS750 NPs zeigten im Rac1-Pull-down bei einer Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l ein vergleichbares Ergebnis wie bei den nicht oberflächenmodifizierten PBio.S4 NPs. Auch hier war weder Basisaktivierung noch messbare Aktivierung durch PBio.S4.PICS750 NPs festzustellen (Abbildung 3.5e).



**Abbildung 3.5e:** Pulldown Assay für Rac1 in humanen AMs. Inkubation mit PBioS4.PICS750 (5 ng/ $\mu$ l) in Kulturmedium erfolgte über unterschiedliche Zeiträume bei 37° C im Brutschrank. Als Negativkontrolle (Co) diente ein Ansatz mit unbehandelten Zellen. Positivkontrolle: GTP $\gamma$ S induzierter Austausch von Rac/Cdc-GDP zu Rac/Cdc-GTP. Pro Ansatz wurden mit Ausnahme von der Positivkontrolle 400 statt 200  $\mu$ g Protein verwendet. (Repräsentatives Ergebnis).

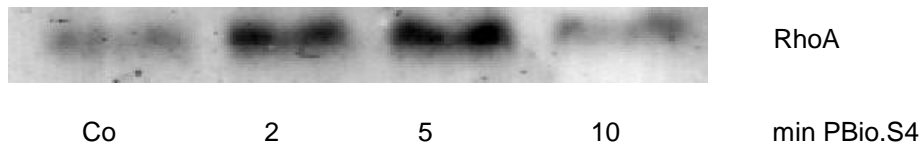
Während der in dieser Arbeit vorgestellten und von Frau Birgit Wahl (Diesel et al., 2013) vorgenommenen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass Cdc42 in humanen AMs und ausdifferenzierten THP-1 nahezu überhaupt nicht im aktivierten Zustand vorliegt und wenn überhaupt, nur sehr schwer durch Stimulantien in den aktivierten Zustand zu überführen ist. An AMs wurden daher keine weiteren Untersuchungen für Cdc42 durch Pulldown Assay vorgenommen.

In den Ergebnissen des Pulldowns für die RBD bindende GTPase RhoA war eine leichte Aktivierung durch PBio.S4 und PBio.S4.PICS750 in humanen AMs nachzuweisen (Abbildungen 3.5f und 3.5g). Beim Testen von PBio.S4.PICS750 NPs an humanen AMs genügte dafür bereits eine NP-Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l (Abbildung 3.5g).



**Abbildung 3.5f:** Pulldown Assay für RhoA in humanen AMs. Inkubation mit PBio.S4 (50 ng/ $\mu$ l) in Kulturmedium erfolgte über unterschiedliche Zeiträume bei 37° C im Brutschrank. Als Negativkontrolle (Co) diente ein Ansatz mit unbehandelten Zellen. Positivkontrolle: fMLP (100 nM) für 2 Minuten bei 37° C im Brutschrank. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder #0671. Pro Ansatz wurden 400  $\mu$ g Protein verwendet. (Repräsentatives Ergebnis).





**Abbildung 3.5g:** Pulldown Assay für RhoA in humanen AMs. Inkubation mit PBio.S4.PICS750 (5 ng/ $\mu$ l) in Kulturmedium erfolgte über unterschiedliche Zeiträume bei 37° C im Brutschrank. Als Negativkontrolle (Co) diente ein Ansatz mit unbehandelten Zellen. Pro Ansatz wurden 400  $\mu$ g Protein verwendet. (Repräsentatives Ergebnis).

### 3.6 Konfokalmikroskopische Untersuchung fluoreszierender Silikapartikel in Makrophagen

Unter Verwendung eines konfokalen Laser-Raster Mikroskops sollte die intrazelluläre Lokalisation von internalisierten Silikapartikeln, bzw. die daraus entstandenen Agglomerate in differenzierten THP-1 und humanen AMs untersucht werden. Um Silikapartikel für die CLSM zu modifizieren, wurden diese während der Synthese mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 590 NHS-Ester markiert. Zum Einsatz kamen derartige NPs mit und ohne PEGylierter Oberfläche (PBio.S4 und PBio.S4.PICS750).

Die mit einer Konzentration von 50 ng/μl in Kulturmedium verdünnten NPs wurden für zehn Minuten im Ultraschallbad (Branson Ultrasonic Deaner B42, 240 Watt, 50 HZ) behandelt, bevor die Inkubation über einen Zeitraum von 90 Minuten mit den Zellen im Brutschrank bei 37° C stattfand. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das NP-haltige Medium abgesaugt und die adhären Zellen zu Präparaten für die CLSM verarbeitet (Kapitel 2.12.2 ff.). Am Zeiss LSM 510 META kamen zur Anregung der Fluorophore die Laser HeNe 543 für ATTO 590 NHS-Ester und Argon 488 für Alexa Fluor® 488 zum Einsatz.

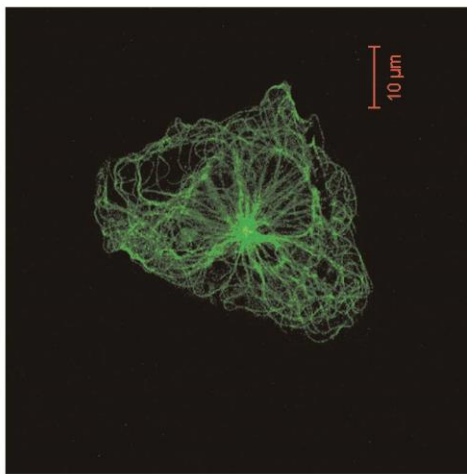
Übersicht 3.6a zeigt CLSM-Aufnahmen des  $\alpha$ -Tubulin-Zytoskeletts ausdifferenzierter THP-1 (grün) und die intrazelluläre Anordnung internalisierter fluoreszierender Partikel im Vergleich zu Zellen mit nicht-internalisierten Partikeln und Kontrollzellen ohne vorausgegangener NP-Inkubation (Co). Die Untersuchungen lassen erkennen, dass die nicht-PEGylierten NPs PBio.S4 (Abbildung 3.6a3 und 3.6a4, rot) internalisiert wurden und nach der Inkubationszeit von 90 Minuten nahe des MTOC im Innern der Zellen akkumuliert lokalisiert waren. Dies bestätigte sich auch im entsprechenden Versuch mit humanen AMs, wie der in Abbildung 3.6b gezeigte Z-Stack erkennen lässt.

Im Gegensatz dazu konnte bei den oberflächenmodifizierten NPs PBio.S4.PICS750 nahezu keine Internalisierung der NPs in die Zellen durch CLSM nachgewiesen werden. Lediglich an der Zelloberfläche haften gelegentlich Partikel bzw. Agglomerate (Abbildung 3.6a5 und 3.6a6). Bereits bei der mikroskopischen Auswertung im Zuge der Fluorometrischen Bestimmung von F-Aktin konnten die

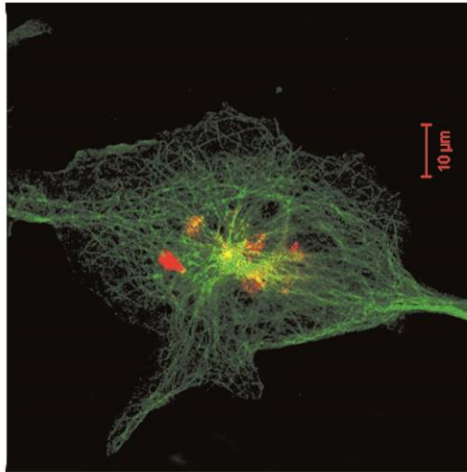
Unterschiede gezeigt werden, was die Internalisierung der NPs mit und ohne Oberflächenmodifikation betrifft (Abbildung 3.4d).

Morphologische Abweichungen des Tubulin-Zytoskeletts ließen sich in Abhängigkeit einer Inkubation mit den verwendeten Silikapartikel nicht feststellen. Einzig die räumliche Verdrängung des Tubulins durch das Volumen der akkumulierten Partikel verändert das Tubulinnetzwerk.

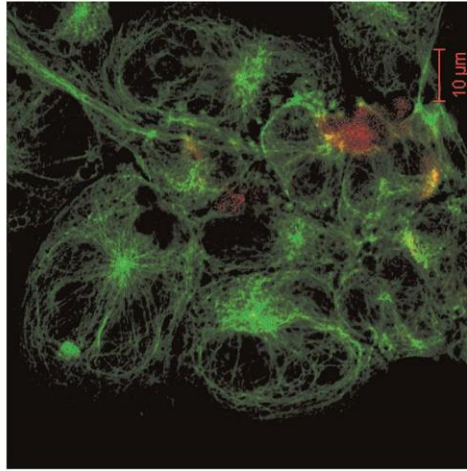
## 3.6a Konfokalmikroskopische Untersuchung fluoreszierender Silikapartikel in Makrophagen



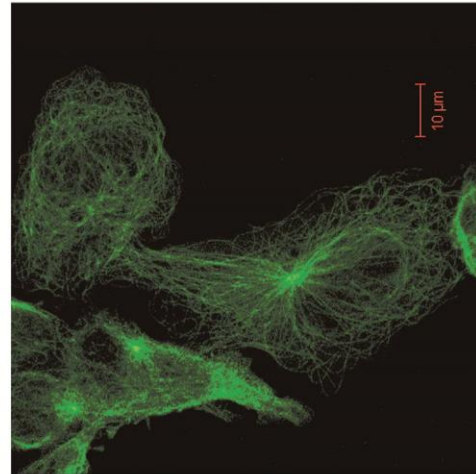
3.6a1: Co



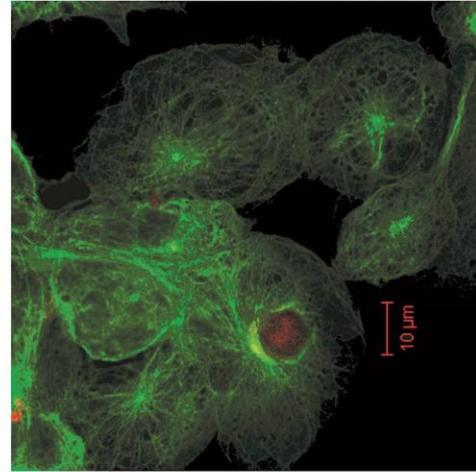
3.6a3: nicht-PEGylierte NPs nach 90 min



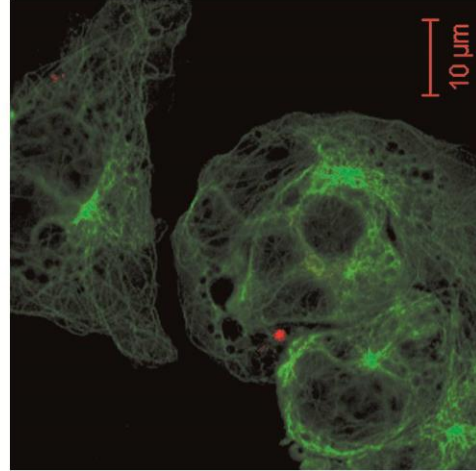
3.6a5: PEGylierte NPs nach 90 min



3.6a2: Co



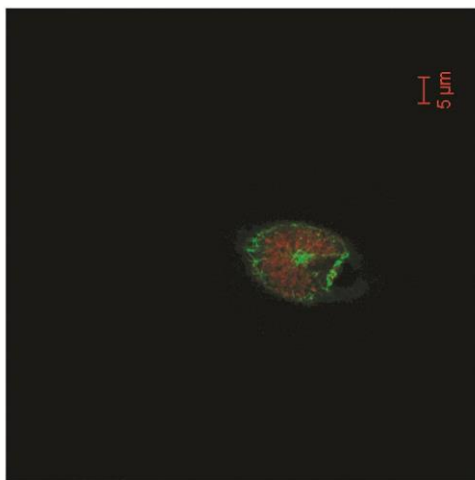
3.6a4: nicht-PEGylierte NPs nach 90 min



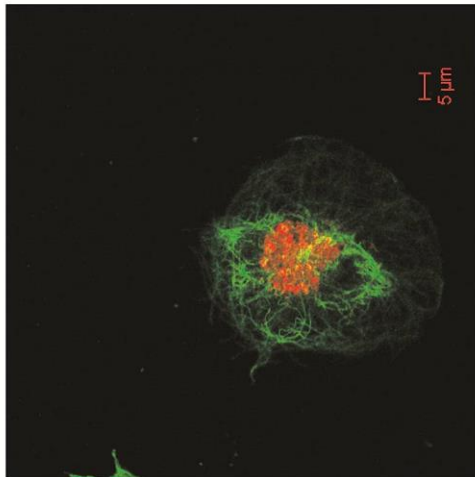
3.6a6: PEGylierte NPs nach 90 min

**Abbildung 3.6a:** Repräsentative CLSM-Aufnahmen differenzierter THP-1 (alpha-Tubulin, grün) mit PEGylierten und nicht-PEGylierten fluoreszierenden Silikapartikeln (rot). 3.6a1 + 3.6a2: Kontrolle = Co. 3.6a3 + 3.6a4: THP-1 mit PBio.S4. 3.6a5 + 3.6a6: THP-1 mit PBio.S4.PICS750. Aufnahmen: Zeiss LSM 510 META.

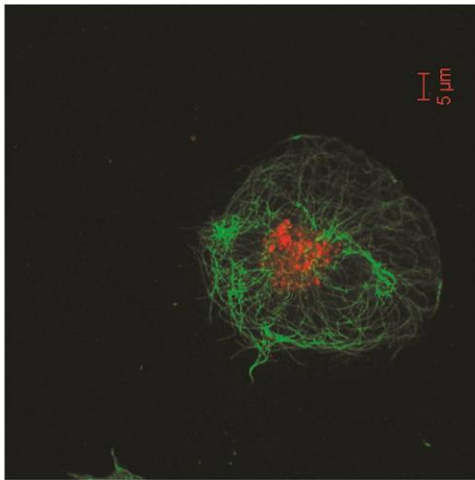
## 3.6b Konfokalmikroskopische Untersuchung fluoreszierender Silikapartikel im Makrophagen



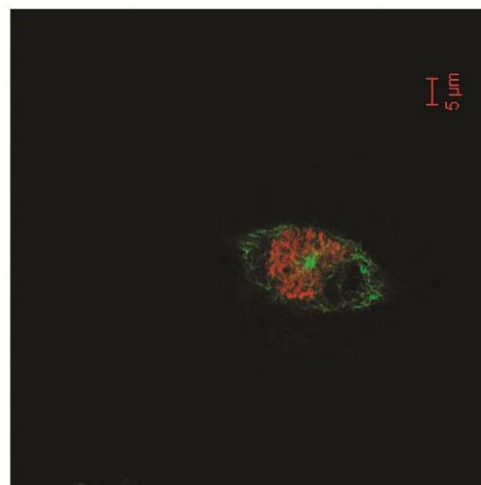
3.6b1



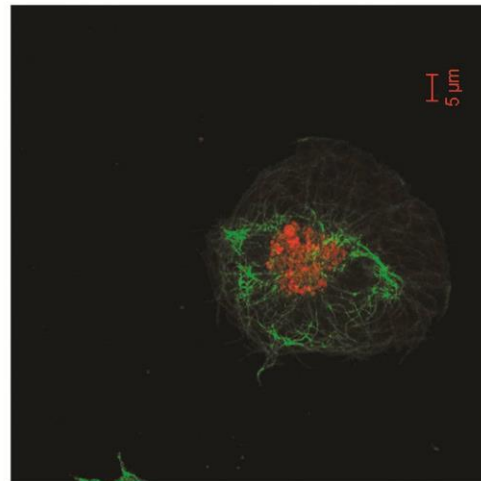
3.6b3



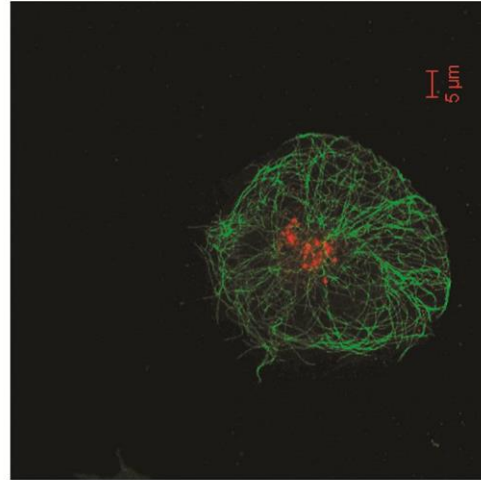
3.6b5



3.6b2



3.6b4

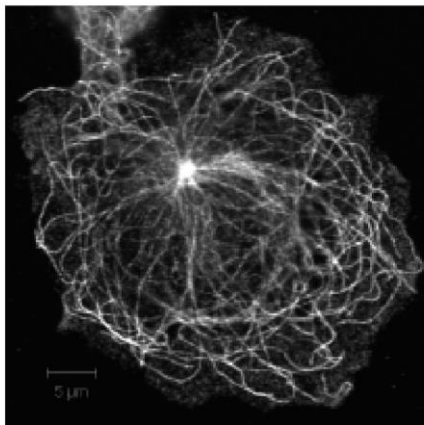


3.6b6

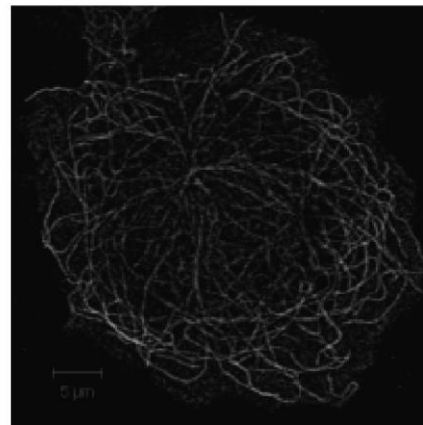
Abbildung 3.6b1-6: Repräsentativer Z-Stapel eines humanen Alveolarmakrophagen (alpha-Tubulin, grün) mit nicht-PEGylierten fluoreszierenden Silikapartikeln (PBio. S4, rot). Aufnahmen: Zeiss LSM 510 META.

### 3.7 Bildbearbeitung konfokalmikroskopischer Aufnahmen

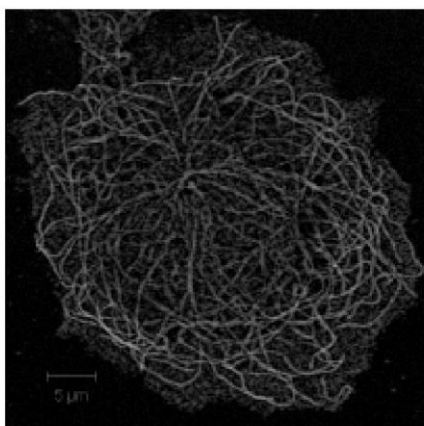
Die CLSM-Aufnahme 3.7a1 zeigt das MT-Filamentnetzwerk eines humanen AM nach dem *Immunostaining* (2.12.5) des  $\alpha$ -Tubulins mit Alexa Fluor 488. Ausgehend von der CLSM-Aufnahme fand eine schrittweise Bildbearbeitung statt. Zunächst wurden durch das Entfernen grober, sehr heller Strukturen unter Verwendung des morphologischen Hochpassfilters *white-top-hat* (heller Zylinderhut) die hellen Strukturen auf dunklem Hintergrund extrahiert (Abbildung 3.72). Nach dem Invertieren des Bildes wurde eine Gammakorrektur vorgenommen, durch die der lokale Grauwert modifiziert werden konnte (Abbildung 3.73). Zum Entrauschen des Bildes wurde ein *Ecken- und Kohärenzverstärkender anisotroper Diffusionsfilter* verwendet, der das Rauschen exponentiell unterdrückt und so die Filamentstruktur entlang der Konturen schärft (Abbildung 3.74).



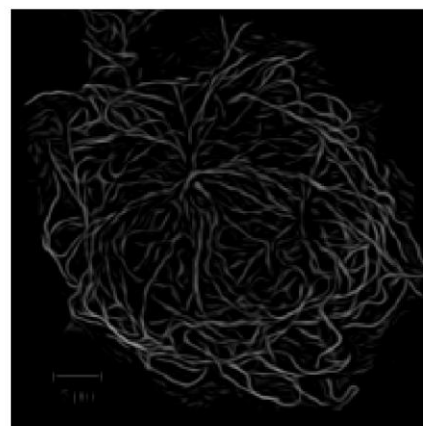
3.7a1: Originalbild



3.7a2: Bearbeitung mit dem hellen Zylinderhut



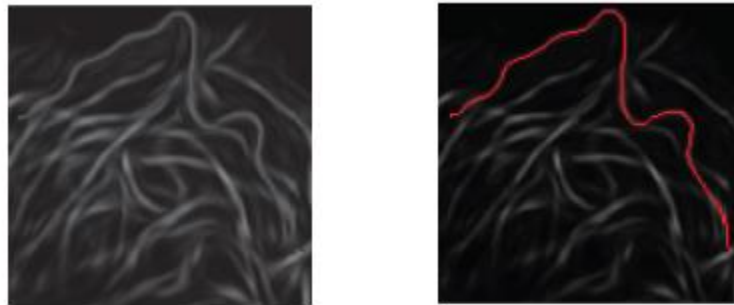
3.7a3: Weiterverarbeitung mit Gammakorrektur



3.7a4: Weiterverarbeitung mit ECED-Filter

**Abbildung 3.7a:** Schrittweise Bearbeitung konfokalmikroskopischer Aufnahmen (entnommen aus der Diplomarbeit von Frau Ines-Kristin Weber (2010): Analyse und Modellierung von Fluktuationen intrazellulärer Filamente.

Mit dem überarbeiteten Bild als Grundlage, ließen sich mittels Trackingalgorithmus einzelne Filamente in der betrachteten Ebene nachverfolgen und somit aus dem Netzwerk extrahieren (Abbildung 3.7b). Auf die so erlangten Informationen konnten die Fluktuationsanalyse und schließlich die Bestimmung der Persistenzlänge im 2D-Bereich erfolgen. Die dabei resultierende Länge lässt sich aufgrund eines systematischen Fehlers dem die Fourieranalyse unterliegt nur schätzen und liegt bei etwa 10  $\mu\text{m}$ .

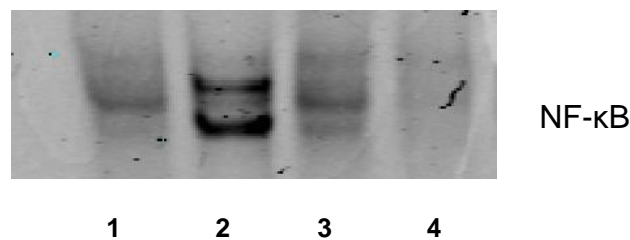


**Abbildung 3.7b:** Schrittweise Ausschnitt eines Tubulinnetzwerks und extrahiertes Filament (rot), (entnommen aus der Diplomarbeit von Frau Ines-Kristin Weber (2010): Analyse und Modellierung von Fluktuationen intrazellulärer Filamente.

### 3.8 EMSA zum Nachweis eines NP-induzierten Anstiegs an NF- $\kappa$ B in IMs

NF- $\kappa$ B ist eine Familie dimerer Transkriptionsfaktoren die eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Zellaktivierung spielt (Nishikori, 2005). Aufgrund des nachgewiesenen Ineinandergreifens der an der ROS-Synthese beteiligten Signaltransduktionen und dem regulatorischen Einfluss der Rho-GTPasen (Gregg et al. 2004), sollte im Rahmen dieser Arbeit mit dem Electrophoretic Mobility Shift Assay (Kapitel 2.11) die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in humanen IMs, induziert durch die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten SiO<sub>2</sub>-NPs PBio.S4 (50 ng/ $\mu$ l) überprüft werden.

Das Ergebnis des Assays zeigt einen Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Zellen, die mit PBio.S4 NPs vorbehandelt wurden (Abbildung 3.8a).



**Abbildung 3.8a: Repräsentativer** EMSA zum Nachweis eines NP-induzierten Anstiegs an NF- $\kappa$ B in IMs durch PBio.S4 NPs (50 ng/ $\mu$ l). (1) Kontrolle mit unbehandelten Zellen. (2) Inkubation der Zellen mit PBio.S4 (50 ng/ $\mu$ l) in Kulturmedium für 45 Minuten im Brutschrank. (3) Inkubation mit PBio.S4 (50 ng/ $\mu$ l) in Kulturmedium für 75 Minuten im Brutschrank. (4) Kontrolle mit nicht markiertem NF- $\kappa$ B-Oligonukleotid (Kompetitor).

### 3.9 Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Nur NP-Suspensionen, die negativ reagierten wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Der Endotoxingehalt lag somit unterhalb der Nachweisgrenze des Tests für LPS (0,03 EU/ml). Die Positiv- und Negativkontrollen zeigten unabhängig von Partikelanwesenheit keine unerwarteten Ergebnisse.



## **4. Diskussion**

#### 4.1 Vorwort

Im direkten Umgang mit NPs sollte generell Vorsicht geboten sein. Die DFG hat in der MAK- und BAT-Werteliste 2011 den MAK-Wert für die alveolengängige Staubfraktion (A-Fraktion) deutlich verschärft und von 3 mg/m<sup>3</sup> auf 0,3 mg/m<sup>3</sup> festgelegt (Hahn und Möhlmann, 2011). Die Arbeitsstättenverordnung (ArbStättV) des Bundes sieht bzgl. der Mindestluftvolumen je ständig anwesenden Arbeitnehmer in Abhängigkeit des Schweregrades der zu verrichtenden Arbeit einen Mindestluftvolumen von 12 – 18 m<sup>3</sup> vor. Für jede zusätzliche mehr als nicht nur vorübergehende Person kommen lt. ArbStättV weitere 10 m<sup>3</sup> hinzu.

#### 4.2 Interferenzen zwischen Nanomaterialien und *in vitro* Zellkultur-Assays

Industriell gefertigte Nanosuspensionen besitzen in der Regel einen nicht-physiologischen pH-Wert oder sind mit zytotoxischen Agenzien stabilisiert und werden nicht entwickelt um mit *in vitro* Zellkultur-Assays, die in meist proteinhaltigen isotonischen Medien mit physiologischem pH-Wert durchgeführt werden, kompatibel zu sein. Das De-/Agglomerationsverhalten der NPs wird stark von Faktoren wie pH-Wert, der jeweils anwesenden Proteine und der vorherrschenden Ionenstärke beeinflusst, insbesondere durch divalente Ionen wie z.B. Ca<sup>2+</sup> (Schulze et al., 2008).

Bereits die zuverlässige Charakterisierung der NPs mittels DLS gestaltet sich schwierig, da in Abhängigkeit der in ihrer Zusammensetzung variierenden Kultur-/Dispersionsmedien unterschiedliche Ergebnisse möglich sind. So wirken beispielsweise Serumproteine durch Ausbildung einer sterischen Schutzhülle an der Partikeloberfläche (*Corona*) einer Agglomeration der dispergierten NPs entgegen (Geys et al., 2006, Schulze et al., 2008, Tenzer et al., 2011). Als Folge kann die von der Größe der Partikel abhängige Penetration der Zellmembran, bzw. die zelluläre Antwort beeinflusst werden (Nemmar et al., 2001, Renwick et al., 2001, Tenzer et al., 2011).

Darüber hinaus spielt das Zetapotential der Partikel eine wichtige Rolle bzgl. der Aufnahme von Partikeln in Zellen. Orr et al. (2007) konnten zeigen, dass Partikel mit

einem höheren Zetapotential besser von Zellen aufgenommen werden, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass die kationischen Serumproteine an der Partikeloberfläche für eine verbesserte Bindung an die anionische Zellmembran verantwortlich sind (Chithrani et al., 2006).

Um Nanomaterialien *in vitro* auf ihre akute Toxizität zu überprüfen, werden oftmals Vitalitätstests wie der MTT-Test (Mosman, 1983) durchgeführt. Zahlreiche Studien kommen bei derartigen Vitalitätstests häufig zu gegensätzlichen Ergebnissen hinsichtlich einer akuten Zytotoxizität treffen. So auch im Fall der zahlreich untersuchten *Carbon Nanotubes*, die in vielen Studien basierend auf den Ergebnissen des MTT-Tests zum einen mit einer hohen akuten Zytotoxizität eingestuft werden (Magrez et al., 2006; Sharma et al., 2007), zum anderen in diesem Zusammenhang häufig als nicht akut-toxisch auftreten (Dumortier et al., 2006; Davoren et al., 2007).

Wörle-Knirsch et al. (2006) setzten sich mit dieser Problematik auseinander und kamen im Rahmen ihrer Untersuchungen zu aufschlussreichen Erkenntnissen. Die für den MTT-Test eingesetzten *Carbon Nanotubes* wurden aus dem Testsystem extrahiert und einer TEM-Untersuchung unterzogen. Auf den daraus hervorgegangenen Aufnahmen ist zu erkennen, wie *Carbon Nanotubes* und MTT-Formazan miteinander verklebt sind. Diese irreversiblen Verklebungen können weder mit Ultraschallbehandlung, noch mit diversen Lösemitteln (Aceton, SDS, usw.) gelöst werden. MTT-Formazan wird somit dem Testsystem entzogen und verfälscht als Folge die quantitative Auswertung des MTT-Tests, aus welcher sich eine Aussage über die Zytotoxizität ableiten lässt. Bei anderen Vitalitätstests, die ebenfalls auf Formazan-Farbstoffen (z.B. WST-1-Test) basieren, lässt sich eine derartige Interferenz nicht feststellen (Wörle-Knirsch et al., 2006).

Interaktionen des Farbstoffs sind jedoch nicht nur für *Carbon Nanotubes* denkbar. In einer Studie von Laaksonen et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass mikroskalige mesoporöse Silikapartikel, ähnlich wie die *Carbon Nanotubes* (Wörle-Knirsch et al., 2006), durch Interaktion mit MTT-Formazan zu einer augenscheinlichen Vitalitätsminderung führen. Monteiro-Riviere et al. (2009) konnten Interferenzen zwischen *Quantum Dots* (QDs) und in Vitalitätsassays vorkommende Farbstoffe,

bzw. deren Produkte, ausgelöst durch Adsorption von Kulturmediumbestandteilen und Zytokinen an die QDs, nachweisen. Eine Studie von Samberg et al. (2010) ergab, dass Carbon-ummantelte Silber-NPs mit einem Durchmesser von 25 und 35 nm mit dem MTT-Test interferieren.

Um derartige Interferenzen zwischen NPs und MTT-Tests die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden zu selektieren und deren Einfließen in die Interpretation der Messdaten hinsichtlich einer Aussage über die akute Toxizität zu vermeiden, wurde der MTT-Test auch in Abwesenheit von Zellen durchgeführt. Die daraus resultierende Übersicht an Abweichungen der Absorptionswerte zeigt bei welchen Konzentrationen der verwendeten NPs auf  $ZrO_2$ -Basis es zu Interferenzen kommen kann ( $c[ZrO_2\text{-NPs}] > 0,016 \text{ g/l}$ ) und welche Konzentrationen keine nachteilige Auswirkung auf die Zuverlässigkeit der Messwerte ausüben.

Bevor Nanomaterialien mittels Zellkulturassays untersucht werden, findet in der Regel zunächst die Überprüfung der Nanomaterialien auf Anwesenheit von Endotoxinen, wie z.B. LPS statt. Schulze et al. (2008) zeigte in diesem Zusammenhang den Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) betreffend mögliche Interferenzen. Nanosuspensionen mit NPs aus  $TiO_2$  oder  $CeO_2$  (jeweils  $32 \mu\text{g/ml}$ ) reduzieren die messbare Endotoxinkonzentration um ca. 50 %. Bei Nanosuspensionen mit oberflächenmodifizierten  $ZrO_2$ -NPs in derselben Konzentration erhöht sich dieser Wert auf 70 %. Bei den für diese Arbeit durchgeführten LAL-Tests waren keine der geschilderten Interferenzen festzustellen. Unabhängig von Partikelanwesenheit verliefen die Positiv- und Negativkontrollen unauffällig.

Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, wie sehr die Ergebnisse und deren zuverlässige Aussagekraft über die toxikologische Einstufung (gerade im Bereich der Nanotoxikologie) aus allgemein etablierten Assays, sowie der damit verbundenen Messmethoden von physikalischen Effekten und der biologischen Umgebung abhängig sind. Trotzdem ist bei der Betrachtung der Ergebnisse stets zu beachten, dass die in Studien eingesetzten NP-Konzentrationen für *in vitro* stattfindende Assays meist höher sind als die übliche Umweltbelastung oder die am Arbeitsplatz bedingte Exposition.

### 4.3 Akute Toxizität

Als am häufigsten verwendeter Zytotoxizitäts-Test wurde der MTT-Assay im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der akuten Zytotoxizität angewandt (Mosmann, 1983; Kiemer et al., 2002c; Sharma et al., 2007; Hoppstädter et al., 2010). Der Vorversuch mit der Ethanolverdünnungsreihe (1-10 % (V/V)) zeigte das erwartete Ergebnis. Mit ansteigender Ethanolkonzentration fand eine kontinuierliche Abnahme der Zell-Vitalität statt. Ab einer Ethanol-Konzentration von 2 % (V/V) war eine signifikante Minderung der Vitalität festzustellen, was auch in anderen Studien gezeigt werden konnte (Sawyer et al., 1994). Ab einer Ethanol-Konzentration von 4 % (V/V) war nahezu keine Zell-Vitalität mehr zu detektieren.

Die mit  $ZrO_2$ -NPs durchgeführten MTT-Tests führten in Abhängigkeit der verwendeten Zellen und der Oberflächenmodifikation im Bereich der niedrigeren Verdünnungsstufen zu auseinanderweichenden Absorptionswerten. Beim Verdünnen, insbesondere beim ersten Kontakt mit serumhaltigem Kulturmedium, kam es zur massiven Agglomeration/Sedimentation. Daher ist es fraglich, ob die errechneten Konzentrationen der NPs mit den tatsächlichen Konzentrationen in den durchgeführten Tests übereinstimmen.

Auffällig ist zudem das Einhergehen der erhöhten Absorptionswerte bei Verwendung stärkeren NP-Konzentrationen, insbesondere bei Betrachtung der aus den MTT-Tests hervorgegangenen Ergebnisse, die ohne Zellen durchgeführt wurden. Hauptursache für die stärkere Absorption bei Inkubation höherer NP-Konzentrationen sind wohl die Agglomerate, die nicht nur Licht absorbieren, sondern im Messstrahl für die Entstehung von Streulicht verantwortlich sind. Außerdem zeigen Kumari et al. (2009) im UV-vis Absorptionsspektrum für  $ZrO_2$ -Nanomaterialien unter anderem ein deutliches Absorptionsvermögen im für den MTT-Test relevanten Wellenlängenbereich zwischen 500 und 600 nm.

Die auf akute Toxizität getesteten NPs scheinen, zumindest in den rein rechnerisch angegebenen Konzentrationen, den Vorgaben der MAK- und BAT-Wertelisten 2011 zu entsprechen, wenn man statt von einer Nanosuspension von einer

alveolargängigen Staubfraktion ausgeht und einen Substanzverlust durch die geschilderten Interferenzen vernachlässigt.

#### 4.4 Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln in Zellen

Um die verwendeten Nanomaterialien toxikologisch einschätzen zu können bedarf es Untersuchungen, die über die Bewertung der akuten Toxizität hinausgehen. Die in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen (insbesondere konfokalmikroskopischen) Untersuchungen sollen dazu beitragen, die zelluläre Aufnahme und die damit zusammenhängenden Veränderungen der Zellmorphologie in Abhängigkeit der Partikeleigenschaften, wie z.B. unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten, zu erschliessen. Sowohl die im *Phagozytose-Assay* verwendeten Mikrosphären, als auch die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Silika-NPs (bzw. –Agglomerate) finden sich nach der Aufnahme in die Zelle am Zellkern, bzw. nahe des MTOCs wieder. Gemeinhart et al. (2005) zeigen ein vergleichbares Ergebnis in ihrer Studie mit CHO-Zellen und Silikapartikeln, die über einen endosomal-lysosomalen Weg internalisiert wurden.

Der für diese Arbeit mit dem Konfokalen Laserrastermikroskop erstellte *Z-Stack* am humanen AM mit fluoreszierenden Silikapartikeln zeigt die Lokalisation der Partikel im Innern der Zelle nahe des MTOCs und ermöglicht somit einen dreidimensionalen Blick in die zu betrachtende Zelle nach Internalisierung der Silikapartikel.

Das Ausmaß der Partikelaufnahme wird nicht nur von der Partikelgröße bestimmt, sondern auch von Eigenschaften wie der Morphologie, Oberflächenmodifikation bzw. der Tendenz, Agglomerate oder Aggregate zu bilden (Limbach et al., 2005; Wiesner et al., 2006) oder die Fähigkeit zur Ausbildung einer *Corona* (Rothen-Rutishauser et al., 2006; Tenzer et al., 2011). In diesem Zusammenhang besitzt auch die Zelloberfläche mit ihren Rezeptoren und Membranlipiden, eine maßgeblich regulierende Funktion für die möglichen Aufnahmemechanismen (Rothen-Rutishauser et al., 2006).

Chithrani et al. (2006) untersuchten die intrazelluläre Aufnahme unterschiedlich geformter Gold-NPs mit unterschiedlicher Größe und zeigten anhand der Ergebnisse eine zwei bis vier Mal höhere Aufnahme von sphärischen Goldpartikeln im Vergleich zu zylindrischen Partikeln mit einem Seitenverhältnis von 1:5.

Meng et al. (2011) untersuchten die Aufnahme von mesoporösen Silika-NPs durch makropinozytotische Mechanismen in Abhängigkeit unterschiedlicher Seitenlängenverhältnisse der NPs. Dabei demonstrierten sie, dass mesoporöse Silika-NPs mit einem bestimmten Seitenlängenverhältnis bevorzugt endozytiert werden. Weitere Untersuchungen zeigten den Zusammenhang zur Aktivierung von kleinen GTPasen (z.B. Rac1, Cdc42) und die daraus folgende Aktivierung des Zytoskeletts, insbesondere des Aktins.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse weisen darauf hin, dass NPs an Aufnahmeprozesse beteiligte Zytoskelettstrukturen, wie z.B. Aktin, beeinflussen. Die differenzierten THP-1 zeigten nach 15 und 30 Minuten Inkubationsdauer mit ATTO 647 NHS-ester markierten Silika-NPs eine Erhöhung des gemessenen F-Aktin Gehaltes, wobei besonders die Inkubation mit der PEGylierten Variante PBio.S5.PICS750 zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte führte.

Die mit ATTO 590 NHS-ester markierten Silika-NPs (PBio.S4/PBio.S4.PICS750) führten trotz der Ähnlichkeit mit den Silika-NPs PBio.S4/PBio.S4.PICS750 über die gesamte Inkubationsdauer zu keiner Erhöhung der Messwerte, sondern unter anderem sogar zur signifikanten Fluoreszenzminderung. Verantwortlich für die gegensätzlichen Ergebnisse könnten verfälschende *Quenching*-Effekte sein, hervorgerufen durch die im Präparat kolokalisierten Fluorochrome auf Rhodaminbasis (*TRITC* und *ATTO 590 NHS-ester*).

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl die nicht-PEGylierten Silikapartikel nach der Internalisierung in die Zellen, als auch die sogenannte *stealth*-Charakteristik PEGylierter NPs (Thierry et al., 2008; Rio-Echevarria et al., 2010). Die PEGylierten NPs entgehen auf diese Weise größtenteils der Internalisierung durch Makrophagen (Rio-Echevarria et al., 2010). Obwohl die PEGylierten NPs ganz im Gegensatz zu den nicht-oberflächenmodifizierten Silikapartikeln nachgewiesenermaßen kaum

beispielsweise endozytotischen Aufnahmeprozessen der Makrophagen unterliegen, können trotzdem bei der Inkubation mit Makrophagen vergleichbare Veränderungen in der Dynamik des zytosolischen F-Aktins festgestellt werden.

Bezüglich der vermehrten Aktinpolymerisation nach Aufnahme von NPs in das Zellinnere, lassen die o.g. Erkenntnisse darauf schließen, dass die von den Makrophagen aufgenommenen, unPEGylierten NPs *PBio.S5* durch ihren auf Carborhodamin-Struktur basierenden Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 NHS-Ester, ähnlich wie ATTO 590 NHS-Ester, einen gewissen fluoreszenzmindernden Effekt auf TRITC ausüben könnten.

#### **4.5 Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen durch Nanopartikel-Exposition**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten kleinen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Signaltransduktionskaskaden, die für die Dynamik des F-Aktins verantwortlich sind.

In zahlreichen Studien untersuchte man die Einflüsse von Nanomaterialien auf den Aktivierungsgrad der vorgestellten GTPasen (Fröhlich und Roblegg, 2011; Meng et al., 2011) und die damit zusammenhängende Dynamik des F-Aktins (Huang et al., 2008; Nabeshi et al., 2001).

Als Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitäts-Assays lassen sich aktivierte Rho-GTPasen bei Inkubation von Makrophagen mit den hier verwendeten NPs verzeichnen. Ob und wie stark die Aktivierung ausfällt, scheint dabei von den jeweiligen Partikeleigenschaften und der jeweils zu betrachtenden kleinen Rho-GTPase abhängig zu sein. Darüber hinaus spielen die Inkubationszeit und Partikelkonzentration eine Rolle.

Eine RhoA-Aktivierung ist sowohl für die oberflächenmodifizierten als auch für die nicht-oberflächenmodifizierten NPs in den verwendeten Makrophagen detektierbar. Huang et al. (2008) beobachten bei der Untersuchung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) mit mesoporösen FITC-Silika-NPs den



gleichen Effekt. Meng et al. (2011) hingegen berichten von keiner wahrnehmbaren RhoA-Aktivierung in HeLa-Zellen ausgelöst durch Silika-Nanomaterialien. Neben der RhoA-Aktivierung resultierte bei Huang et al. ebenfalls ein Anstieg des F-Aktins aus der 30-minütigen NP-Inkubation. Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten NPs mit ATTO 647 NHS-Ester bestätigt sich dieser Effekt nach 15 und 30 Minuten Inkubationsdauer mit differenzierten THP-1.

Die durchgeführten Untersuchungen des Rac1-Aktivierungsgrades ergaben ebenfalls ein positives Ergebnis. Unabhängig von der Oberflächenmodifikation aktivieren die eingesetzten fluoreszierenden Silika-NPs bei einer Konzentration von 50 ng/µl die kleine GTPase Rac1. Meng et al. (2011) untersuchten unterschiedlich geformte Silika-Nanomaterialien unter Verwendung von HeLa-Zellen. Aus der Studie geht hervor, dass die jeweilige Form der Nanoteilchen einen erheblichen Einfluss auf den Aktivierungsgrad der kleinen GTPase Rac1 ausübt. Lt. Meng et al. aktivieren sphärische Silika-NPs im Vergleich zu zylindrischen NPs mit einem bestimmten Kantenlängenverhältnis weniger. Der Durchmesser der für die Studie verwendeten sphärischen NPs lag bei ca. 110 nm, die Maße zylindrischer Nanomaterialien lagen bei 160 – 190/60 – 90 nm. Sicherlich kann es in Abhängigkeit der jeweils eingesetzten Zellen zu Unterschieden kommen. In den für diese Arbeit eingesetzten Makrophagen, kam es anders als bei den von Meng et al. verwendeten HeLa-Zellen, durch Inkubation mit sphärischen Silikapartikeln der ungefähr gleichen Größenordnung zu einer deutlichen Aktivierung von Rac1.

Meng et al. (2011) berichten von einer erhöhten Cdc42-Aktivierung durch ausschließlich die oben genannten zylindrischen Silika-Nanomaterialien im Vergleich zu sphärischen und zylindrischen Silika-Partikeln die von den genannten Kantenlängenverhältnissen abweichen. Anitei und Hoflack schildern die Rolle von Cdc42 bei der Clathrin-vermittelten Endozytose detailliert. Fröhlich und Roblegg (2011) berichten in Zusammenhang mit NPs aus nichtfunktionalisiertem Silber, TiO<sub>2</sub> und SiO<sub>2</sub> von Clathrin-vermittelter Endozytose als entsprechenden Aufnahmemechanismus in die Zelle. Obwohl demnach Cdc42 eine entscheidende Rolle für die Clathrin-vermittelte Endozytose von unter anderem NPs spielt, konnte in den untersuchten Makrophagen keine Cdc42-Aktivierung durch Inkubation mit Silika-NPs mittels Aktivitäts-Assay nachgewiesen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse indizieren eine durch die verwendeten Silika-NPs bedingte Aktivierung der wesentlich an inflammatorischen Vorgängen beteiligten Rho-GTPasen und weisen stark auf eine unter anderem Rho-GTPasen beeinflusste Aktin-abhängige Aufnahme der NPs in die Zelle hin. Geiser et al. (2005) vermuten zwar, dass die von Ihnen untersuchten TiO<sub>2</sub>-NPs mit einem Durchmesser von 22 nm durch passive Diffusion in die Zellen gelangen, jedoch legen z.B. Stoeger et al. (2006) dar, dass sogar noch kleinere Gold-NPs mit einem Durchmesser von 5 – 8 nm nicht *via* passive Diffusion in Zellen eindringen (Fröhlich und Roblegg 2011).

#### **4.6 NP-induzierter Anstieg von NF-κB in humanen Interstitiellen Makrophagen**

Seit langem ist die schädliche Wirkung von inhalierten Quarzpartikeln bekannt, die in der Lunge beispielsweise Silikose verursachen können, die mit der Freisetzung von ROS/RNS einhergehen und schließlich unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB herbeiführen (Fubini und Hubbard 2003). Mittlerweile stehen durch die zunehmend vielseitige Verwendung und Exposition von synthetischen Nanomaterialien nicht mehr nur die kristallinen, sondern vor allem synthetisch hergestellte Nanomaterialien wie die amorphen Silika-NPs unter diesen Gesichtspunkten im Fokus toxikologischer Untersuchungen (Park und Park et al., 2008; Li et al., 2010; Liu und Sun, 2010; Nabeshi et al., 2011; Sun et al., 2011; Wu et al., 2011; Tang et al., 2012).

Der Transkriptionsfaktor NF-κB besteht aus einem dimeren Proteinkomplex, dessen einzelne Proteine aus der NF-κB/Rel-Familie stammen. Der Aktivierungsgrad von NF-κB ist stark von Faktoren wie z.B. oxidativem Stress (Liu und Sun, 2010; Corbalan et al., 2011) und/oder Aktivierung von Rho-GTPasen abhängig (Shimizu et al., 2007; Unfried et al., 2007).

Eine Studie mit Silika-NPs und HUVECs (*Human Endothelial Cells*) von Corbalan et al. (2011) zeigt interessanterweise die partikelinduzierte Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität von NF-κB in den Zellen. Die stärkste partikelinduzierte Aktivitätssteigerung von NF-κB geht demnach für Silikapartikel mit einem

Durchmesser von 10 nm und in einer Konzentration von 10 µg/ml nach einer Stunde aus der Studie hervor. 50 und 150 nm große Silikapartikel üben diesbezüglich in einer Konzentration von 50 µg/ml immer noch einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen aus. 500 nm große Silikapartikel zeigen bei gleichen Bedingungen keine signifikante Aktivitätserhöhung von NF-κB. Liu und Sun (2010) experimentierten mit 20 nm messenden Silika-Sphären an HUVECs. Aus den durchgeführten Untersuchungen resultiert eine signifikante Aktivitätserhöhung von NF-κB nach 24-stündiger Inkubation mit den Partikeln bei einer Konzentration von 200 µg/ml.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bzgl. der partikelinduzierten NF-κB Aktivitätssteigerung reihen sich sehr gut in die Ergebnisse der vorgestellten Studien ein. Der mit humanen IMs durchgeführte EMSA zeigt eine partikelinduzierte Aktivitätssteigerung von NF-κB nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten an. Die für den EMSA eingesetzte Konzentration an unPEGylierten Silikapartikeln lag wie bei zahlreichen genannten Studien ebenfalls bei 50 ng/µl (= 50 µg/ml). EMSAs, die mit PEGylierten Silika-NPs durchgeführt wurden, konnten leider nicht endgültig ausgewertet werden, da die PEGylierten Silika-NPs scheinbar mit dem Assay interferieren.

#### **4.7 NP-induzierte Effekte auf die Organisation der Mikrotubuli**

Obwohl bei Betrachtung der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen mikroskopischen Aufnahmen keine morphologischen Abweichungen des MT-Netzwerks nach Inkubation mit Silika-NPs auffielen, bedarf es sicherlich noch genauerer Untersuchungen um diesbezüglich eine exakte Aussage treffen zu können.

Die Struktur des Zytoskeletts wird durch zahlreiche aktive Prozesse bestimmt, so dass morphologische Veränderungen ein wichtiges Indiz für potenziell Zellschädigendes Verhalten sind. Aus diesem Grund werden die in dieser Arbeit entstandenen Konfokalaufnahmen zur Rekonstruktion und Analyse in den Arbeitsgruppen Weickert/Santen verwendet.

In einem zweiten Schritt werden die Ergebnisse dieser Arbeit zur Validierung eines mesoskopischen Modells des intrazellulären NP-Transports genutzt. Erste Ergebnisse der Modellierung zeigen, dass die Struktur des Netzwerks großen Einfluss auf die Agglomerationsprozesse der NPs haben.

Da in dieser Arbeit nach Inkubation mit Silika-NPs sowohl eine vermehrte Aktivierung von Rho-GTPasen als auch ein Anstieg der Aktin-Polymerisation in Makrophagen gemessen werden konnte, ist von regulatorischen und/oder strukturellen Wechselwirkungen mit dem MT-Zytoskelett auszugehen. Die wechselseitige Beeinflussung der Aktin- und MT-Netzwerke über Rho-GTPasen wurde in einer Vielzahl an Studien diskutiert und nachgewiesen (Krendel et al., 2002; Rodriguez et al., 2003; Machacek et al., 2009; Meiri et al., 2012).

Khaleghian et al. (2010) untersuchten den Einfluss von Eisenoxid-NPs ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ NPs) auf das MT-Netzwerk und konnten dabei eine sinkende Tubulin-Polymerisation feststellen. Zudem induzierten die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NPs eine Verschiebung des *steady state equilibrium*.

## **5. Literaturverzeichnis**

- Abdelmohsen, K., Gerber, P. A., von Montfort, C., Sies, H., Klotz, L. O. (2003). Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43 - Role of glutathione and tyrosine phosphatases, *Journal of Biological Chemistry* 278: 38360-38367.
- Adamson, P., Paterson, H. F., Hall, A. (1992). Intracellular localization of the P21 rho proteins. *Journal of Cell Biology* 119, 617-627.
- Aderem, A., Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Aderem, A. A., Wright, S. D., Silverstein, S. C., Cohn, Z. A. (1985). Ligated Complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 161, 617-622.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* 2, 675-680.
- Aktories, K. (1997). Bacterial toxins that target Rho proteins. *Journal of Clinical Investigation* 99, 827-829.
- Albrecht, C., Borm, P. J. A., Unfried, K. (2004). Signal transduction pathways relevant For neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 553: 23-35.
- Albert, M. L., Kim, J. I., Birge, R. B. (2000).  $\alpha 5 \beta 1$  integrin recruits the CrkII Dock180 - rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nature Cell Biology* 2, 899-905.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.

- Allen, L. A. and Aderem, A. (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 184, 627-637.
- Amann, K. J., Pollard T. D. (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nature Cell Biology* 3, 306-310.
- Anitei, M., Hoflack, B. (2012). Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nature Cell Biology* 14, 11–19. doi:10.1038/ncb2409 Published online 22 December 2011.
- Aspenstrom, P. (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 95-102.
- Bagrodia, S., Cerione, R. A. (1999). Pak to the future. *Trends in Cell Biology* 9, 350-355.
- Bainton D. (1981). The discovery of lysosomes. *Journal of Cell Biology* 91:66S–76S.
- Benard, V., Bohl, B. P., Bokoch, G. M. (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *Journal of Biological Chemistry* 274:13198-13204.
- Bishop, A. L., Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal* 348, 241–255.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A. and Pollard, T.D. (2000a). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404, 1007-1010.
- Blott, E. J., Griffiths, G. M. (2002). Secretory lysosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 122-131.

- Boguski, M. S., McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- BMBF (2004). Nanotechnologie erobert Märkte.
- BMBF (2010). NanoCare und NanoNature - verantwortungsvoller Umgang mit der Nanotechnologie. <http://www.bmbf.de/de/5915.php>.
- Bokoch, G. M., Bohl, B. P., Chuang, T. H. (1994). Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 269, 31674-31679.
- Boes, M., Cerny, J., Massol, R., Op, d. B., Kirchhausen, T., Chen, J., Ploegh, H. L. (2002). T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 418, 983-988.
- Boquet, P., Lemichez, E. (2003). Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends in Cell Biology* 13, 238-246.
- Botelho, R. J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J. D., Meyer, T., and Grinstein, S. (2000). Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Boyte, W. R., Meals, E. A., English, B. K. (1996). Acquired hyporesponsiveness to bacterial lipopolysaccharid and interferon-gamma in RAW 264.7 macrophages. *Shock* 6:218-222.
- Brown, A. M., O'Sullivan, A. J., and Gomperts, B. D. (1998). Induction of exocytosis From permeabilized mast cells by the guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *Molecular Biology of the Cell* 9, 1053-1063.
- Brown, E. J. (1995). Phagocytosis. *Bioessays* 17:109-117.



- Bubb, M., Senderowicz, A., Sausville E., Duncan K., and Korn, E.. 1994.  
Jasp competitively inhibits the binding of phalloidin to F actin. *Journal of Cell Biology* 269:14869–14871.
- Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Hrsg., 2010). *Arbeitsstätten. Arbeitsstättenverordnung, Technische Regeln für Arbeitsstätten.* Bremerhaven: Wirtschaftsverlag NW Verlag für neue Wissenschaft.
- Carlier, M.-F., Criquet, P., Pantaloni, D., Korn, E. D. (1986). Interaction of cytochalasin D with actin filaments in the presence of ADP and ATP. *Journal of Biological Chemistry* 261:2041-2050.
- Caron, E., Hall, A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of Phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Casey, P. J., Solski, P. A., Der, C. J., Buss, J. E. (1989). p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *PNAS U.S.A* 86, 8323-8327.
- Casey, P. J., Thissen, J. A., and Moomaw, J. F. (1991). Enzymatic Modification of Proteins with a Geranylgeranyl Isoprenoid. *PNAS* 88, 8631-8635.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Liu, Y.W., Leonard, M., Pucadyil, T.J., Schmid, S.L. (2009). An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Molecular Biology of the Cell* 20:35 61–71.
- Chen, L. Y., Ptasznik, A., Pan, Z. K. (2004). RhoA and Rac1 signals in fMLP-induced NF-kappaB activation in human blood monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319:629-635.
- Chiang, S. H., Baumann, C. A., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Watson, R. T., Neudauer, C. L., Macara, I. G., Pessin, J. E., Saltiel, A. R. (2001). Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410, 944-948.

- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C.W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters* 6(4), 662-668.
- Chithrani, B. D., Chan, W. C.W. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters* 7(6), 1542-1550.
- Chow, A., Toomre, D., Garrett, W., Mellman, I. (2002). Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* 418, 988-994.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *Journal of Cell Biology* 105, 1473-1478.
- Corbalan, J. J., Medina, C., Jacoby, A., Malinsky, T., Radomski, M. W. (2011). Amorphous silica nanoparticles trigger nitric oxide/peroxynitrite imbalance in human endothelial cells: inflammatory and cytotoxic effects. *International Journal of Nanomedicine* 6:2821–2835.
- Crews, P., Manes, L. V., Boehler, M. (1986). *Tetrahedron Letters* 27, 2797-2800.
- Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H. J., Lyng, F.M. (2007). In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology In Vitro* 21, 438-448.
- Desai, A., Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell Development Biology* 13, 83–117.
- Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G., Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *Journal of Cell Biology* 124, 677-688.

- Diakonova, M., Bokoch, G., Swanson, J. A. (2002). Dynamics of cytoskeletal proteins during Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Molecular Biology of the Cell* 13, 402-411.
- Diesel, B., Hoppstädter, J., Hachenthal, N., Zarbock, R., Cavelius, C., Wahl, B., Thewes, N., Jacobs, K., Kraegeloh, A., Kiemer, A. K. (2013). Activation of Rac1 GTPase by nanoparticulate structures in human macrophages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* doi: 10.1016 / j.ejpb.2012.12.015
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L. A., Duffin, R., Newby, D. E., Mills, N., MacNee, W., Stone, V. (2005). Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure, *Particle and Fibre Toxicology* 2: 10.
- Doussau, F., Gasman, S., Humeau, Y., Vitiello, F., Popoff, M., Boquet, P., Bader, M. F., Poulain, B. (2000). A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 7764-7770.
- Dumortier, H., Lacotte, S., Pastorin, G., Marega, R., Wu, W., Bonifazi, D., Briand, J. P., Prato, M., Muller, S., Bianco, A. (2006). Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Letters* 6, 1522-1528.
- Eggeling, C. et al. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Supplement. Nature* 457, 1159–1162.
- Egger, G. (2005). *Die akute Entzündung - Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität*. Springer 1. Auflage, S. 181.
- Elbert, K. J, Schäfer, U.F., Kim, K. J., Lee, V. H. L, Lehr, C. M. (1999). Monolayers of Human Alveolar Epithelial cells in Primary Culture for Pulmonary Drug Absorption and Transport studies. *Pharm Res* 16:601–608.

- Englert, M., (2009). Einfluss mechanischer Dispergiervverfahren auf Struktur und Eigenschaften duroplastischer Nanoverbundwerkstoffe. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Erickson, J. W., Zhang, C., Kahn, R. A., Evans, T., Cerione, R. A. (1996). Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry* 271, 26850-26854.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629–35.
- Fattoum, A., Hartwig, J. H., Stossel, T. P. (1983). *Biochemistry* 22, 1187-1193.
- Faulstich, H., Trischmann, H., and Mayer, D. (1983). Preparation of tetramethylrhodaminyl-phalloidin and uptake of the toxin into short-term cultured hepatocytes by endocytosis . *Experimental Cell Research* 144 :73-82.
- Feig, L. A. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras family GTPases. *Nature Cell Biology* 1:E25±E27.
- Fickova, M. (2002). Structure and activation of EGF receptor: minireview, *Endocrine Regulations* 36: 87-93.
- Fröhlich, E., Roblegg, E. (2011). Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*.
- Fubini, B., Hubbard, A. (2003), Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine* 34:1507-1516.
- Fürst, R. (2005), Identification of MKP-1 as a central mediator of cytoprotective effects in human endothelial cells: pathways of induction. Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie

- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J. E., Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102, 325-334.
- Gehr, P., Bachofen, M., Weibel, E. R. (1978). The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respiratory Physiology* 32(2): 121–40.
- Gemeinhart, R. A., Luo, D., Saltzman, W. M. (2005). Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Biotechnology Progress* 21, 532-537.
- Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schurch 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. *Environmental Health Perspectives* 113(11):1555–60.
- Geys, J., Coenegrachts, L., Vercammen, J., Engelborghs, Y., Nemmar, A., Nemery, B., Hoet, P. H. M. (2006). In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles. A preliminary study. *Toxicology Letters* 160, 218-226.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J. B., Fleit, H. B. (1994). Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 8878-8884.
- Gleiche, M. (2006). Nanotechnology in Consumer Products. *Nanoforum*.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 329-930.
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *PNAS USA* 105(33), 11613-11618.

- Gregg, D., de Carvalho, D. D., Kovacic, H. (2004). Integrins and coagulation: a role for ROS/redox signaling? *Antioxid. Redox Signal* 6: 757–764.
- Gregoretto, I.V., Margolin, G., Alber, M. S., Goodson, H. V. (2006). Insights into cytoskeletal behavior from computational modeling of dynamic microtubules in a cell-like environment. *Journal of Cell Science* 119:4781–4788.
- Hahn, J.-U., Möhlmann, C. (2011). Neuer A-Staub-Grenzwert – Aspekte für dessen Anwendung. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft*. 71 Nr. 10 – Oktober. IFA – Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Hancock, J. F., Hall, A. (1993). A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO Journal* 12, 1915-1921.
- Hanselmann, R. (2007). Sicherheit der Nanotechnologie. *NanoBioNet Themenreihe, Band 2*.
- Hayden, M. S., Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Development* 18 : 2195- 2224.
- Heald, R., Nogales, E. (2002). Microtubule dynamics. *Journal of Cell Science* 115, 3-4.
- Henley, J. R., Cao, H., McNiven, M. A. (1999). Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *FASEB Journal Supplement* (13) 2:S243–47.
- Heubach, D., Beucker, S., Lang-Koetz, C. (2006). Einsatz von Nanotechnologie in der hessischen Umwelttechnologie, Hessisches Ministerium für Wirtschaft, Verkehr und Landesentwicklung.

- Higgs, H. N., Pollard, T. D. (1999). Regulation of actin polymerisation by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *Journal of Biological Chemistry* 274, 32531-32534.
- Hinshaw, J. E., Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190-192.
- Hoet, P. H. M., Bruske-Hohlfeld, I., Salata, O.V. (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology* 2(12), 1-15.
- Hofmann, A. M., Wurm, F., Hühn, E., Nawroth, T., Langguth, P., Frey, H. (2010). *Biomacromolecules* 568–574.
- Holy, T., Leibler, S. (1994). Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *PNAS USA* 91, 5682-5685.
- Hong-Geller, E., Cerione, R. A. (2000). Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *Journal of Cell Biology* 148, 481-494.
- Hoppstädter, J., (2007). Charakterisierung von Alveolar- und Gewebemakrophagen aus humanem Lungengewebe. Diplomarbeit, UdS: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III
- Hoppstadter, J., Diesel, B., Zarbock, R., Breinig, T., Monz, D., Koch, M., Meyerhans, A., Gortner, L., Lehr, C.M., Huwer, H., Kiemer, A. K. (2010). Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir. Res.*, 11:124.
- Howard, J., Hyman, A. A. (2007). Microtubule polymerases and depolymerases. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 31–35.

- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of Immunology* 162, 3749-3752.
- Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y., Yao, Y., Huang, D., Hao, B., (2008). Internalization of mesoporous silica nanoparticles induces transient but not sufficient osteogenic signals in human mesenchymal stem cells. *Langmuir* 24, 4140–4144.
- Isakov, N. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 6-16.
- Isomura, M., Kikuchi, A., Ohga, N., Takai, Y. (1991). Regulation of binding of rhoB p20 to Membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *Oncogene* 6:1 19-24.
- Iversen, T. G., Skotland, T., Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of Nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6(2): 176-185.
- Janeway, C. A. Jr. (1992). The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annual Review of Immunology* 10, 645-674.
- Johnson, G. L., Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science* 298: 1911-1912.
- Jones, B. W., Means, T. K., Heldwein, K. A., Keen, M. A., Hill, P. J., Belisle, J. T., Fenton, M. J. (2001). Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 1036-1044.



- Kaibuchi, K., Takai, Y. (1991). Posttranslational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene* 6: 515–522.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annual Review of Biochemistry* 68, 459-486.
- Kaplan, G. (1977). Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors In macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* 6, 797-807.
- Kaufmann, S. H. E. (2009) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie Springer-Lehrbuch, II*, 91-98.
- Kawamura, S., Miyamoto, S., Brown, J. H. (2003). Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *Journal of Biological Chemistry* 278:31111–31117.
- Khaleghian, A., Riazi, G. H., Ahmadian, S., Ghafari, M., Rezaie, M., Takahashi, A., Nakaya, Y., Nazari, H. (2010). Effect of ferric oxide nanoparticles on microtubules organization. *African Journal of Biochemistry Research* 4:99–104.
- Kiemer, A. K., Weber, N. C., Fürst, R., Bildner, N., Kulhanek-Heinze, S., Vollmar, A. M., (2002c). Inhibition of p38 MAPK activation *via* induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha-induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circulation Research* 90, 874-881.
- Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 187–198.
- Kirchhausen, T. (2002). Clathrin adaptors really adapt. *Cell* 109, 413–416.

- Kjoller, L., Hall, A. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* 253, 166-179.
- Knoll, S.C.M. (2001). Elektrophoretische Formgebung von nanoskaligem Zirkoniumdioxid. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Koch, A. M., Reynolds, F., Merkle, H. P., Weissleder R., Josephson L. (2005). Transport of surface-modified nanoparticles through cell monolayers. *Chembiochem.* 6: 337–345.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Journal of Molecular Cell Biology* 15, 1942-1952.
- Krendel M., Zenke F.T., and Bokoch G.M. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. (2002). *Nature Cell Biology* 4: 294–301.
- Kreyling W., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H. et al. (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 65A:1513–1530.
- Kroschewski, R., Hall, A., and Mellman, I. (1999). Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nature Cell Biology* 1, 8-13.
- Kumari L., Li W. Z., Xu J.M., Leblanc R. M., Wang D. Z., Li Y., Guo H., Zhang J. (2009). Controlled hydrothermal synthesis of zirconium oxide nanostructures and their optical properties. *Crystal Growth & Design* 9, 3874–3880.

- Laaksonen, T., Santos, H., Vihola, H.; Salonen, J., Riikonen, J., Heikkila, T., Peltonen, L., Kumar, N., Murzin, D. Y., Lehto, V. P. & Hirvonen, J. (2007). Failure of MTT as a toxicity testing agent for mesoporous silicon microparticles. *Chemical Research in Toxicology* 20, 1913-1918.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamarche, N. and Hall, A. (1994). GAPs for rho-related GTPases. *Trends in Genetics* 10, 436-440.
- Lamaze, C., Chuang, T. H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M., and Schmid, S. L. (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382, 177-179.
- Laufs U., Liao J. K. (1998). Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry* 273:24266–24271
- Leonhardt H. (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Achte Auflage. Stuttgart, Germany. Thieme Verlag.
- Lerm, M., Schmidt, G., and Aktories, K. (2000). Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiology Letters* 188, 1-6.
- Leverrier, Y. and Ridley, A. J. (2001). Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Current Biology* 11, 195-199.
- Leydecker, S. (2008). *Nano Materials in Architecture, Interior Architecture and Design*. Birkhäuser, Basel.

- Li, J. J., Muralikrishnan, S., Ng, C. T., Yung, L. Y., Bay, B. H. (2010). Nanoparticle-Induced pulmonary toxicity. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood.) 235, 1025–1033.
- Li Q., Verma I. M. (2002). NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2 : 725- 734.
- Liu, X. & Sun, J. (2010). Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress *via* JNK/P53 and NF- $\kappa$ B pathways. *Biomaterials* 31, 8198–8209.
- Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., Gunther, D. & Stark, W. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particles size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science & Technology* 39, 9370-9376.
- Lohmann-Matthes, M. L., Steinmuller, C., Franke-Ullmann, G., (1994). Pulmonary macrophages. *European Respiratory Journal* 7: 1678–1689.
- Luther, W., Malanowski, N. (2004). Das wirtschaftliche Potenzial der Nanotechnologie. *Technikfolgenabschätzung. Theorie und Praxis* 13 (2): 26–33.
- MAK- und BAT-Werte-Liste 2011. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Mitteilung 47. Hrsg.: Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) Weinheim: Wiley VCH 2011.
- Machacek, M. et al. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99–103.
- Machesky, L. M. and Gould, K. L. (1999). The Arp2/3 complex : a multifunctional actin organizer. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 117±121.

- Machesky, L. M. and Hall, A. (1996). Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology* 6, 304–310.
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *Journal of Cell Biology* 127, 107-115.
- Machesky, L. M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F. J., Grogan, A., Totty, N. F., Burlingame, A. L., Husan, A. L. and Segal, A. W. (1997). Mammalian Arp2/3 complex localizes to regions of lamelliopodia protusion and is composed of evolutionary conserved proteins. *Biochemical Journal* 328, 105-112.
- Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J. W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., and Forro, L. (2006). Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Letters* 6, 1121-1125.
- Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J. C., and Chavrier, P. (1998). Fc receptor-Mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO Journal* 17, 6219-6229.
- May, R. C., Caron, E., Hall, A., and Machesky, L. M. (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nature Cell Biology* 2, 246-248.
- May, R. C. and Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 114, 1061-1077.
- Meiri, D., Marshall, C. B., Greeve, M. A., B. Kim, B., Balan, M., Suarez, F., Wu, C., Larose J., Fine, N., Ikura, M., Rottapel, R. (2012). Mechanistic Insight into the Microtubule and Actin Cytoskeleton Coupling through Dynein-Dependent RhoGEF Inhibition. *Mol. Cell* 45, 642–655.

- Meng, H., Yang, S., Li, Z., Xia, T., Zhang, H., Wang, X., et al. (2011). Aspect ratio determines the quantity of mesoporous silica nanoparticles uptake by a small GTP-ase dependent macropinocytosis mechanism. *ACS Nano* 5: 4434e47.
- Mercer, J., Helenius, A. (2009). Virus Entry by Macropinocytosis. *Nature Cell Biology* 11, 510–520.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M. R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *Journal of Cell Biology* 152, 111-126.
- Michaely, P. A., Mineo, C., Ying, Y. S., and Anderson, R. G. (1999). Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *Journal of Biological Chemistry* 274, 21430-21436.
- Miki, H. and Takenawa, T. (1998). Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243, 73-78.
- Miller, G., Archer, L., Pica, E., Bell, D., Senjen, R., Kimbrell, G. (2006). *Nanomaterials, Sunscreens and Cosmetics: Small Ingredients - Big Risks. Friends of the Earth.*
- Mitchison, T. und Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Molecular Probes Product Information MP 07473 (1994).
- Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., Zhang, L. W. (2009). Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 234:222–235.
- Morrison, M., Joseph T. (2006). *Nanotechnology in Agriculture and Food, nanoforum.*

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55-63.
- Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lutcke, A., Parton, R. G., and Zerial, M. (1996). Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 384, 427-432.
- Murphy, G. A., Jillian, S. A., Michaelson, D., Philips, M. R., D'Eustachio, P., and Rush, M. G. (2001). Signaling mediated by the closely related mammalian Rho family GTPases TC10 and Cdc42 suggests distinct functional pathways. *Cell Growth & Differentiation* 12, 157-167.
- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., et al. (2011). Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Particle and Fibre Toxicology* 8:1.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627.
- Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H. M., Verbruggen, A., Nemery, B. (2001). Passage of Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Systemic Circulation in Hamster; *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164, 1665-1668.
- Nemmar, A., Hoet, P. H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B. (2002a). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411–414.
- Nichols, B. J., Ungermann, C., Pelham, H. R., Wickner, W. T., and Haas, A. (1997). Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* 387, 199-202.

- Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., and Ui, M. (1994). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* 269, 22732-22737.
- Nishikori, M. (2005). Classical and alternative NF- $\kappa$ B activation pathways and their roles in lymphoid malignancies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 45:15–24.
- Nobes, C. D and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the Assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nobes, C. and Marsh, M. (2000). Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Current Biology* 10, R739-R741.
- Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A. et al. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 65A:1531–1543.
- Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. et al. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology* 16(6/7):437–445.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 113, 823-839.
- Oberdörster, G., Stone, V., Donaldson, K. (2007). Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology* 1:2–25.
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*. 11, 545-554.



- Orr, G., Panther, D. J., Phillips, J. L., Tarasevich, B. J., Dohnalkova, A., Hu, D., Teeguarden, J. G. & Pounds, J. G. (2007). Submicrometer and nanoscale inorganic particles exploit the actin machinery to be propelled along microvilli-like structures into alveolar cells. *ACSNano* 1(5), 463-475.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* 97, 805-815.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P. and Carlier, M. F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nature Cell Biology* 2, 385-391.
- Park, E. J., Park, K. (2009). Oxidative stress, proinflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters* 184, 18-25.
- Park, J. B. (2003). Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Experimental & Molecular Medicine* 35:325-335.
- Pearse, B. M., Smith, C. J., and Owen, D. J. (2000). Clathrin coat construction in endocytosis. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 220-228.
- Perret, E., Lakkaraju, A., Deborde, S., Schreiner, R., Rodriguez-Boulan, E. (2005). Evolving endosomes: how many varieties and why? *Current Opinion in Cell Biology* 17, 423-34.
- Peters, A., Veronesi, B., Calderon-Garciduenas, L., Gehr, P., Chen, L. C., Geiser, M., Reed, W., Rothen-Rutishauser, B., Schürch, S., Schulz, H., (2006). Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Particle and Fibre Toxicology* 3.
- Pitt, A., Mayorga, L. S., Stahl, P. D., and Schwartz, A. L. (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *Journal of Clinical Investigation* 90, 1978-1983.

- Platt, N., da Silva, R. P. and Gordon, S. (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends in Cell Biology* 8, 365-372.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D. (2000). Biophysics of actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 545-576.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Qualmann, B. and Mellor, H. (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochemical Journal* 371, 233-241.
- Racoosin, E. L. and Swanson, J. A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *Journal of Cell Biology* 121, 1011-1020.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J.Exp.Med.* 183, 1161-1172.
- Ravetch, J. V. (1997). Fc receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 9, 121-125.
- Ravetch, J. V. and Clynes, R. A. (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 16, 421-432.
- Renwick, L. C.; Donaldson, K.; Clouter, A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001, 172, 119-127.

- Ridley, A. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Ridley, A. J. (2001, [1]). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic*. 2, 303-310.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
- Rio-Echevarria I. M., Selvestrel F., Segat D., Guarino G., Tavano R., Causin V., Reddi E., Papini E. and Mancin F. (2010). Highly PEGylated silica nanoparticles: "ready to use" stealth functional nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry* 20, 2780.
- Robertson, D., Paterson, H. F., Adamson, P., Hall, A., and Monaghan, P. (1995). Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 43, 471-480.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASp and the Arp2/3 complex links CDC42-dependant signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231.
- Rothen-Rutishauser, B. M., Schurch, S., Haenni, B.; Kapp, N. & Gehr, P. (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environmental Science & Technology* 40, 4353-4359.
- Sharma, C. S., Sarkar, S., Periyakaruppan, A., Barr, J., Wise, K., Thomas, R., Wilson, B. L., and Ramesh, G. T. (2007). Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, 2466-2472.

- Schauer, K., Duong, T., Bleakley, K., Bardin, S., Bornens, M. and Goud, B. (2010). Probabilistic density maps to study global endomembrane organization. *Nature Methods* 7, 560-566.
- Schmid, S. L., McNiven, M. A., and De Camilli, P. (1998). Dynamin and its partners: a progress report. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 504–512.
- Schneberger, D., Lewis, D., Caldwell, S., Singh, B. (2010). Expression of toll-like receptor 9 in lungs of pigs, dogs and cattle. *International Journal of Experimental Pathology* 92, 1-7.
- Senda, T., Horiguchi, Y., Umemoto, M., Sugimoto, N. and Matsuda, M. (1997). Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin, which activates a small GTP-binding protein rho, induces membrane organelle proliferation and caveolae formation. *Experimental Cell Research* 230, 163-168.
- Sen, R., Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47 : 921- 928.
- Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M., and Mellman, I. (1999). The receptor recycling Pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *Journal of Cell Biology* 145, 123-139.
- Shimizu S, Tahara M, Ogata S, Hashimoto K, Morishige K, Tasaka K, Murata Y. Involvement of nuclear factor-kB activation through RhoA/Rho-kinase pathway in LPS-induced IL-8 production in human cervical stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 181–187.
- Sigma-Aldrich Inc., M2128 Product Information Sheet.
- Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1998). Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* 95, 871-874.

- Stahl, P. D. and Ezekowitz, R. A. (1998). The mannose receptor is a pattern Recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology* 10, 50-55.
- Stendahl, O. I., Hartwig, J. H., Brotschi, E. A., and Stossel, T. P. (1980). Distribution of actinbinding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *Journal of Cell Biology* 84, 215-224.
- Stoeger, T., Reinhard, C., Takenaka, S., Schroeppel, A., Karg, E., Ritter, B., Heyder, J., Schulz, H., (2006). Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environmental Health Perspectives* 114, 328–333.
- Stringer, B., Kobzik, L. (1996). Alveolar macrophage uptake of the environmental particulate titanium dioxide: role of surfactant components. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 14(2): 155-160.
- Sun, L., Li, Y., Liu, X., Jin, M., Zhang, L., Du, Z., Guo, C., Huang, P., Sun, Z. (2011). Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in Vitro* 25, 1619-1629
- Swanson, J. A., Johnson, M. T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M., and Araki, N. (1999). A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *Journal of Cell Science* 112 ( Pt 3), 307-316.
- Symons, M. and Rusk, N. (2003). Control of vesicular trafficking by rho GTPases. *Current Biology* 13, R409-R418.
- Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W. G., Lentner, B., Möller, W. & Behnke-Semmler, M. (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhalation Toxicology* 18, 733-740.

- Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., Heyder, J. (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats, *Environmental Health Perspectives* 109, 547-551.
- Takenawa, T. and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *Journal of Cell Science* 114, 1801-1809.
- Tang F., Li, L., Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials* 24, 1504–1534.
- Taunton, J. (2001). Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 85–91.
- ten Klooster, J. P., Evers, E. E., Janssen, L., Machesky, L. M., Michiels, F., Hordijk, P., Collard, J. G. (2006). Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *Biochemical Journal* 397:39–45.
- Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Rekić, A., Knauer, S. K., Bantz, C., Nawroth, T., Bier, C., Sirirahanapan, J., Mann, W., Treuel, L., Zellner, R., Maskos, M., Schield, H., Stauber, R. H. (2011). Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis, *ACS Nano* 5, 7155–7167.
- Thews/Mutschler/Vaupel (2007). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wiss. Verlag-Ges., Stuttgart 2007.
- Thierry, B., Zimmer, L., McNiven, S., Finnie, K., Barbe, C., Griesser, H. J. (2008). Electrostatic self-assembly of PEG copolymers onto porous silica nanoparticles. *Langmuir* 24, 8143-8150.
- Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2006). The budding yeast endocytic pathway. *Journal of Cell Science* 119, 4585–4587.

- Traub, L. M., Downs, M. A., Westrich, J. L., and Fremont, D. H. (1999). Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8907-8912.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L. O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S., Schins, R. P. F. (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms, *Nanotoxicology* 1: 52-71.
- Ungewickell, E. (1999). Clathrin: a good view of a shapely leg. *Current Biology* 9, R32-R35.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* 11, 2295-2322.
- Verhey, K. J. and Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152-2160.
- Viel, B. (2008). Strukturierte Kolloidpartikel für ultrahydrophobe, schmutzabweisende Oberflächen [Dissertation]. TU Darmstadt.
- Wagner, V., Zweck, A. (2006). Nanomedizin: Innovationspotentiale in Hessen für Medizintechnik und Pharmazeutische Industrie. Hessisches Ministerium für Wirtschaft, Verkehr und Landesentwicklung.
- Wasdo, S. C., Barber, D. S., Denslow, N. D., Powers, K. W., Palazuelos, M., Stevens, S. M., Moudgil, B. M., Roberts, S. M. (2008). Differential binding of serum proteins to nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology* 5, 92-115.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105-108.

- Wiesner, M. R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. & Biswas, P. (2006).  
Assesing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 40, 4336-4345.
- Willumsen, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G., and Lowy, D. R. (1984). The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310, 583-586.
- Wilson, L., Jordan, M. A. (1995). Microtubule dynamics: taking aim at amoving target. *Chemistry & Biology* 2:5 69–73
- Winder, S. J., and Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science* 118: 651–654.
- Wright, S. D. and Silverstein, S. C. (1983). Receptors for C3b and C3bi promote Phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *Journal of Experimental Medicine* 158, 2016-2023.
- Wu, J., Wang, C., Sun, J., Xue, Y. (2011). Neurotoxicity of Silica Nanoparticles: Brain Localization and Dopaminergic Neurons Damage Pathways. *ACS Nano* 5 (6), 4476-4489.
- Yin, H. L., Albrecht, J. H. and Fattoum, A. (1981). Identification of gelsolin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *Journal of Cell Biology* 91, 901-906.
- Zheng, Y. (2001). Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 724-732.
- Zheleznyak, A. and Brown, E. J. (1992). Immunoglobulin-mediated phagocytosis by Human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 12042-12048.



## **6. Eigene Veröffentlichungen**

Hoppstadter, J., Diesel, B., Zarbock, R., Breinig, T., Monz, D., Koch, M., Meyerhans, A., Gortner, L., Lehr, C. M., Huwer, H., Kiemer, A. K. (2010). Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respiratory Research* 11:124.

Diesel, B., Hoppstädter, J., Hachenthal, N., Zarbock, R., Cavellius, C., Wahl, B., Thewes, N., Jacobs, K., Kraegeloh, A., Kiemer, A. K. (2013). Activation of Rac1 GTPase by nanoparticulate structures in human macrophages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84, 315-324.

## **7. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie, Fakultät für Pharmazie der Universität des Saarlandes angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer bedanken, die es mir ermöglicht hat, an diesem interessanten und komplexen Thema an Ihrem Institut arbeiten zu können und für ihre wissenschaftliche Unterstützung, nette Betreuung und Geduld über die letzten Jahre.

Bei Herrn Professor Dr. Marc Schneider bedanke ich mich herzlich für die Ratschläge am Konfokalmikroskop und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei den Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Neue Materialien Saarbrücken bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere bei Frau Dr. Annette Kraegeloh, die stets äußerst zuverlässig, hilfsbereit und kompetent kooperierte.

Herrn PD Dr. Hanno Huwer und seinen Mitarbeitern in der SHG Klinik Völklingen danke ich für die Überlassung des Lungengewebes.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr danke ich für die Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Isolation von Makrophagen.

Herrn Prof. Dr. Ludger Santen und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, u.a. Frau Ines Weber, sowie Prof. Dr. Joachim Weickert und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die interessante und interdisziplinäre Kooperation.

Aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rolf Müller möchte ich mich vor allem bei Frau Jennifer Herrmann für die Unterstützung am *BD Pathway 855* bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Birgit Wahl für die sehr gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Ergänzung beim Erarbeiten von Ergebnissen, vor allem was die Arbeit am Mikroskop angeht.

Frau Dr. Britta Diesel und Frau Dr. Jessica Hoppstädter danke ich für die Demonstration bestimmter Arbeitsschritte, Ratschläge und Anregungen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die fachliche Unterstützung und darüber hinaus insbesondere Herrn Theo Ranßweiler, Herrn Dr. Josef Zapp, Herrn Klaus Gladel und Frau Rosel Bilke für zahlreiche amüsante und motivierende Gespräche.

Für die Hilfe bei der Durchführung praktischer Arbeiten bedanke ich mich bei Frau Dr. Akram Ziaei, sowie bei den Praktikant(inn)en Sandra Petry, Birte Schmitz-Dumont, Lisa Eifler, Natascha Freudenreich und Simon Räsch.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Mutter Marie Zarbock und meinem einzigartigen Freundeskreis bedanken, die mich stets unterstützt haben und auf die ich zu jeder Zeit zählen konnte.