Aufnahme und Toxizität von Silbernanopartikeln im Intestinalmodell Caco-2

vorgelegt von
Diplom Lebensmittelchemikerin
Linda Böhmert
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rotard
Gutachter: Prof. Dr. Lothar W. Kroh
Gutachter: Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14. Januar 2014

Berlin 2014
D 83

Aufnahme und Toxizität von Silbernanopartikeln im Intestinalmodell Caco-2

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)

angefertigt am
Bundesinstitut für Risikobewertung
Abteilung 5 – Lebensmittelsicherheit
Fachgruppe 53 – Ernährungsrisiken, Allergien und neuartige Lebensmittel

eingereicht im
Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie
Fakultät III Prozesswissenschaften
Technische Universität Berlin

von
Linda Böhmert

Berlin 2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Linda Böhmert, erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

_____

Berlin, den

Die praktische Anfertigung der vorliegenden Arbeit erfolgte im Zeitraum von April 2010 bis März 2013 am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Fachgruppe 53 – Ernährungsrisiken, Allergien und neuartige Lebensmittel der Abteilung 5 – Lebensmittelsicherheit.

Gutachter:

Prof. Dr. Lothar W. Kroh

Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen IV

1 Einleitung 1

1.1 Nanotechnologie, Nanomaterialien, Nanopartikel 1

1.1.1 Verwendung von Nanomaterialien 3

1.1.2 Rechtliche Regelungen zu Nanomaterialien 4

1.1.3 Einflussfaktoren auf die Toxizität von Nanopartikeln 6

1.2 Silbernanopartikel 11

1.3 Die gastrointestinale Barriere 14

1.3.1 Die intestinale Aufnahme von Nanopartikeln 16

1.3.2 Zelluläre Modelle der intestinalen Barriere 18

2 Zielstellung 20

3 Material 21

3.1 Chemikalien 21

3.2 Kits und Verbrauchsmaterialien 22

3.3 Geräte 23

4 Methoden 24

4.1 Charakterisierung der Silbernanopartikel 24

4.2 Zellkultur 29

4.2.1 Passagieren der Zellen 29

4.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen 30

4.2.3 Zellzahlbestimmung 30

4.2.4 Mycoplasmentest 31

4.2.5 Aussaat, Inkubation und Auswertung 31

4.3 Aufnahme von Nanopartikeln 32

4.3.1 Kultivierung im Transwell® 32

4.3.2 TEM 34

4.4 Zytotoxizitätsmessung 34

4.4.1 CellTiter-Blue® - Cell Viability Assay 35

4.4.2 DAPI-Färbung 35

4.5 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus 36

4.5.1 Einfluss der Ionenfreisetzung 36
4.5.1.1 Silberbestimmung 36
4.5.1.2 Quantitative *real time* RT- PCR 37
4.5.2 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Morphologie der Zellen 40
4.5.3 Impedanzmessung – zeitlicher Verlauf der zellulären Reaktion 40
4.5.4 Messung der Apoptose 41
4.5.4.1 Annexin V Färbung und FACS Messung 41
4.5.4.2 Caspase Messung 42
4.5.5 Messung des oxidativen Stresses 43
4.5.5.1 Dichlorofluoreszein (DCF) Assay 43
4.5.5.2 Zytotoxizität nach Vorinkubation mit Antioxidantien 43
4.5.5.3 Glutathion Assay 44
4.5.6 Messung des Calciumeinstroms 44
4.5.7 Messung des mechanischen Stresses 45
4.5.8 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials 45
4.5.9 Transkriptomanalysen 45
4.5.9.1 Zellernte, RNA-Isolierung, -Qualitätskontrolle und cDNA Synthese 45
4.5.9.2 Micro-Array 46
4.5.9.3 PCR-Array 47

5 Ergebnisse 49
5.1 Silbernanopartikelaufnahme im Intestinalmodell 49
5.1.1 Silbertransport im Transwell® 49
5.1.2 TEM-Bilder der Nanopartikelaufnahme 50
5.2 Zytotoxizität von Silbernanopartikeln 53
5.2.1 Einfluss des Zellkulturmediums auf die Zytotoxizität 53
5.2.2 Einfluss des Inkubationsvolumens auf die Zytotoxizität 56
5.2.3 Einfluss der Zelllinie auf die Zytotoxizität 57
5.2.4 Einfluss der Nanopartikelbeschichtung auf die Zytotoxizität 59
5.3 Wirkungsmechanismus von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen 61
5.3.1 Einfluss der Ionenfreisetzung der Silbernanopartikel 61
5.3.1.1 Trennung von Partikel und Ionen mittels Zentrifugation 61
5.3.1.2 Trennung von Partikeln und Ionen mittels Dialyse 64
5.3.2 Einfluss auf die Morphologie der Caco-2 Zellen 66
5.3.3 Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Reaktion der Caco-2 Zellen 68

5.3.4 Induktion von Apoptose in Cac-2 Zellen 71
5.3.5 Induktion von oxidativem Stress in Caco-2 Zellen 73
5.3.5.1 Dichlorofluorescein Assay 73
5.3.5.1 Zytotoxizität nach Vorinkubation mit Antioxidantien 74
5.3.5.2 Glutathion Assay 74
5.3.6 Induktion von Calciumeinstrom in Caco-2 Zellen 75
5.3.7 Induktion von mechanischem Stress in Caco-2 Zellen 77
5.3.8 Induktion von mitochondrialer Depolarisation in Caco-2 Zellen 78
5.3.9 Transkriptomanalyse der Caco-2 Zellen 79
5.3.9.1 Micro-Array 79
5.3.9.2 PCR-Array 81

6 Diskussion 88
6.1 Aufnahme von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen 88
6.2 Einflussfaktoren auf die Zytotoxizität von Silbernanopartikeln 91
6.3 Wirkungsmechanismus von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen 94
7 Zusammenfassung 108
8 Summary 110
Danksagung VIII
Literaturverzeichnis IX
Abbildungsverzeichnis XXIV
Tabellenverzeichnis XXVIII
Anhang XXIX
Liste der Genabkürzungen XXIX
Nanopartikeleigenschaften der Literatur XXXIX
TEER-Messung und FITC-Dextran Durchtritt im Transwell® XLIII
Ingenuity Pathway Analyse XLVI

Abkürzungen

Die Liste der Abkürzungen der Gene befindet sich im Anhang.

7AAD	7-Aminoactinomycin D
A4F	asymmetrische Fluss Feldfluss Fraktionierung (*asymmetric flow field flow fractionation*)
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ATP	Adenosintriphosphat
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
BUND	Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland e. V.
cDNA	komplementäre DNS (*complementary DNA*)
CEN	Europäisches Komitee für Normung (*Comité Européen de Normalisation*)
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CKK	Tripeptid: Cystein – Lysin – Lysin
CTB	CellTiter-Blue® Assay
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	2´,7´-Dichlorofluorescein
DCFH	2´,7´-Dichlorodihydrofluorescein
DCFH-DA	2´,7´-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
DECHEMA	Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLS	dynamische Lichtstreuung (*dynamic light scattering*)
DMEM	Zellkulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNS)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie (*energy dispersive X-ray spectroscopy*)
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*)
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
FACS	Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*)
FAE	Follikel-assoziiertes Epithelgewebe
FCS	fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*)
GSH	reduziertes Glutathion

GSSG	oxidiertes Glutathion
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma – mass spectrometry*)
IPA	Ingenuity Stoffwechselweg Analyse Software (*Ingenuity Pathway Analyse*)
ISO	internationale Organisation für Normung (*International Organization for Standardization*)
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
JRC	gemeinsame Forschungsstelle der Europäischen Kommission (*Joint Research Centre*)
MEM	Zellkulturmedium (*Minimum Essential Medium Eagle*)
MRP	*multidrug Resistance-associated* Proteine
MWCO	Ausschlussgrenze (*Molecular Weight Cut Off*)
NAC	*N*-Acetylcystein
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotids
NM300	Tensid-beschichtete Silbernanopartikel vom JRC
NTA	Methode zur Größenbestimmung von dispergierten Partikeln (*Nanoparticle tracking analysis*)
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)
PAA	Polyacrylamid
PAS	Färbetechnik (*periodic acid-Schiff*)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)
PBS/T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
PDHA	Poly-2,3-hydroxypropylacrylamid
PEG	Polyethylenglycol
PVA	Polyvinyl-alcohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR (*reverse transcription PCR*)
RIN	Maß für die RNA-Integrität (*RNA integrity number*)
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen specie*)
RPMI	Zellkulturmedium (*Roswell Park Memorial Institute*)
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (*Small-angle X-ray scattering*)
SEM	Rasterelektronenmikroskopie (*scanning electron microscope*)
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand (*trans-epithelial electrical resistance*)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TS	technische Spezifikation (*Technical Specification*)
UDP	Uridindiphosphat
VCI	Verband der Chemischen Industrie e.V.
WGA	Weizenlektin (*Wheat germ agglutinin*)
ZZulV	Zusatzstoff-Zulassungsverordnung

1 Einleitung

1.1 Nanotechnologie, Nanomaterialien, Nanopartikel

Das Präfix Nano- bezeichnet den milliardsten Teil (10^{-9}) einer Maßeinheit. Im Falle der Nanotechnologie bezieht es sich auf die räumliche Dimension in Form von Nanometern [nm], den milliardsten Teil eines Meters. Die Norm DIN CEN ISO/TS 27687 2008 definiert den Nanomaßstab als den Größenbereich von etwa 1 nm bis 100 nm [DIN CEN ISO/TS 27687, 2008]. Dabei ist unter Nanotechnologie keine grundlegend neue Technologie zu verstehen. Vielmehr fasst dieses Wort eine Vielzahl von Technologien und wissenschaftlichen Teilbereichen zusammen, die in irgendeiner Weise mit Bausteinen und Materialien agieren, deren räumliche Abmessungen im Nanometerbereich liegen. Sie ist eine interdisziplinäre Technologie, in die Forschungsergebnisse aus der klassischen Physik, Chemie, Biologie und der Ingenieurswissenschaft einfließen [Weiss *et al.*, 2006]. Sie beinhaltet Anwendungsgebiete im Bereich der Elektronik, Halbleitertechnik, Werkstoffkunde und Materialforschung, Optik, Biotechnologie, Medizin, Pharmazie und Umwelttechnik [BUND, 2008]. Aufgaben der Nanotechnologie sind das Produzieren, Charakterisieren, Manipulieren, Applizieren, Untersuchen, Messen oder Modellieren von biologischen und nichtbiologischen Strukturen im Nanomaßstab [Borm *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2006]. Dieser Größenbereich ist jedoch nicht der Nanotechnologie vorbehalten, es finden sich neben den absichtlich hergestellten Materialien im Nanometerbereich vor allem natürliche Materialien, wie in Abbildung 1 zum Größenvergleich dargestellt.

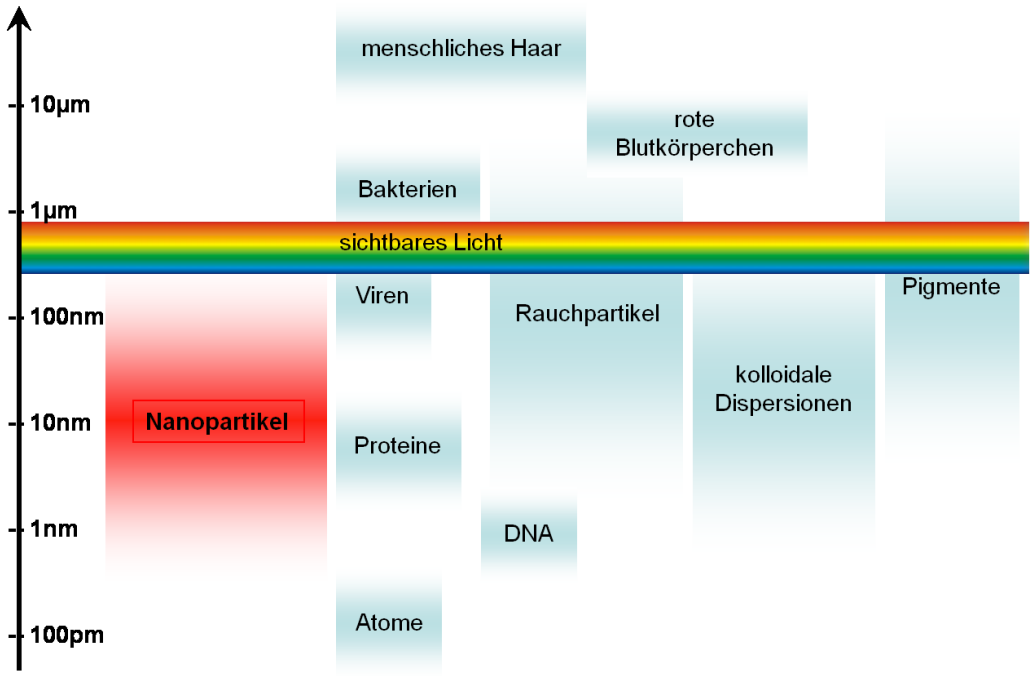

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Größenverhältnisse verschiedener natürlich vorkommender Objekte im Vergleich zu Nanopartikeln [modifiziert nach Hailer, 2010].

Die Nanotechnologie gilt vor allem in der Industrie als eine wichtige Zukunftstechnologie, die zur Entwicklung von Lösungen für grundlegende Probleme unserer Gesellschaft, zum Beispiel in den Bereichen Energieerzeugung, Mobilität oder Umweltschutz, beitragen kann [DECHEMA VCI, 2011]. Jedoch ist der Einsatz von Nanotechnologie nichts Neues, nur die Bezeichnung ist erst in den letzten Jahrzehnten aufgekommen.

Es werden verschiedene Arten von Nanoobjekten unterschieden. Dabei bezieht sich die Größenordnung auf die Korngröße der Primärpartikel, die Schichtdicke oder den Porendurchmesser von Nanomaterialien. Zu den Nanomaterialien werden Nanopartikel, Nanofasern, Nanofilme, die in drei, zwei oder einer Dimension nanoskalig sind und makroskopische Objekte, die aus nanoskalierten Strukturen bestehen oder Nanoporen besitzen, gezählt. Das Deutsche Institut für Normung gibt zusätzlich als Einschränkung vor, dass die Eigenschaften des Nanomaterials nicht den Eigenschaften des Materials in einer größeren Dimension entsprechen und sich üblicherweise nicht ausnahmslos in diesem Größenbereich zeigen. Für derart abweichende Eigenschaften sind die Größengrenzwerte als ungefähre Werte zu betrachten. Zusätzlich wurde der untere Grenzwert eingeführt, um zu vermeiden, dass einzelne Atome oder kleine Atomgruppen als Nanoobjekte oder Bestandteile von Nanostrukturen bezeichnet werden [DIN CEN ISO/TS 27687, 2008]. Optische, elektrische und magnetische Eigenschaften, aber auch Härte, Zähigkeit und Schmelzverhalten von Nanomaterialien unterscheiden sich teilweise deutlich von herkömmlichen Materialien [DECHEMA VCI, 2011]. Der Grund dafür liegt insbesondere in der stark vergrößerten relativen Oberfläche der Nanopartikel, die eine erhöhte chemische Reaktivität nach sich zieht [BUND, 2008].

Die Begriffe Nanopartikel, Kolloide, Feinstaub und Aerosol werden teilweise synonym verwendet, da ihre Abgrenzungen fließend sind. Unter einem Aerosol wird in der Gasphase feinst verteilte, feste oder flüssige Teilchen unterschiedlicher Größe verstanden. Kolloide sind wiederum Feststoffe oder Flüssigkeiten, die meist in einer Flüssigkeit oder einem anderen Feststoff oder Gas fein dispergiert sind [britannica.com, 2013]. Diese Definitionen treffen, wenn die betrachteten Partikel im Nanomaßstab vorliegen oder veränderte Eigenschaften zu ihrem Material in größerer Form zeigen, auch auf Nanopartikel zu. Zusätzlich werden unter dem Begriff Nanopartikel meist gezielt und absichtlich hergestellte Teilchen verstanden. Ohne diese Einschränkung kommen Nanopartikel aber auch als Nebenprodukte in der Natur oder bei industriellen Prozessen vor. Quellen hierfür sind Waldbrände, Vulkanismus und bei hohen Temperaturen ablaufende industrielle Prozesse, wie Verbrennung, Schweißen und Schleifen sowie Abgase von Autos, Lastwagen und Motorrädern. Im Rahmen von Luftverschmutzung werden diese Partikel als ultrafeine Partikel oder Feinstaub bezeichnet [BUND, 2008]. Unabhängig von ihrer Bezeichnung und bewussten oder unbewussten Herstellung unterliegen sie denselben physikalischen Gesetzen.

1.1.1 Verwendung von Nanomaterialien

Die Bandbreite der Anwendungen von Nanotechnologie reicht vom Einsatz in der Elektronikbranche über die Nutzung in der Medizin und Zahnmedizin bis zum Gebrauch bei Kosmetika, Textilien und in der Landwirtschaft [García-Contreras *et al.*, 2011; Bouwmeester *et al.*, 2009]. Schon jetzt enthalten Hunderte von Verbrauchsgütern synthetische Nanomaterialien, auch im Lebensmittelsektor und der Landwirtschaft werden sie eingesetzt. Derzeit sollen 1317 Produkte auf dem weltweiten Markt sein, die laut Hersteller mittels Nanotechnologie hergestellt werden oder diese in irgendeiner Art verwenden. Dabei ist das am häufigsten in der Produktbeschreibung genannte Material Silber, gefolgt von Kohlenstoff einschließlich Fullerenen, Titan und Titandioxid, Silikat und Zink [nanotechproject.org, 2012].

Nanotechnologische Verfahren können in verschiedenen Bereichen der Landwirtschaft, Lebensmittelherstellung und -verpackung eingesetzt werden. So dienen Nanomaterialien als Zusatzstoffe bei der Herstellung von Verpackungsmaterialien, als Fließmittel zu technologischen Zwecken, zur Verkapselung von Nahrungsbestandteilen, als Träger bioaktiver Substanzen oder als Sensoren zur Produktüberwachung [Duncan, 2011; Frewer *et al.*, 2011]. Eine ausführliche Internetsuche zeigt, dass Nanotechnologie in der gesamten Lebensmittelproduktionskette nach Angaben der Hersteller verwendet wird [Bouwmeester *et al.*, 2009]. Ein Ziel der Lebensmittelindustrie ist zum Beispiel stärkere Geschmacks- und Farbstoffe sowie Verarbeitungshilfen zu entwickeln, wodurch die Produktionskosten gesenkt werden können [BUND, 2008]. Durch texturgebende Nanomaterialien sollen die Gehalte an Makronährstoffen wie Fett gesenkt werden oder durch Nanoverkapselungen unerwünschte Aromen maskiert und die Bioverfügbarkeit von Vitamin- und Spurenelementzusätzen erhöht werden. Neben den Lebensmitteln selbst ist besonders die Herstellung von Lebensmittelverpackungen und Lebensmittelkontaktmaterialien ein Bereich für nanotechnologische Anwendungen. Hier spielen vor allem Metalle und Metalloxide eine Rolle [Huyghebaert *et al.*, 2010].

Es gibt viele Produkte die „nano“ zu Werbezwecken tragen; ob tatsächlich Nanotechnologie oder Nanopartikel für die Herstellung verwendet werden, bleibt unklar [BUND, 2008]. Der Nachweis von Nanopartikeln in Lebensmitteln und anderen Produkten ist zurzeit noch schwierig. In ersten Arbeiten vom Niederländischen Institut für Lebensmittelsicherheit wurden Silikatpartikel in pulverförmigen Lebensmitteln nachgewiesen [Peters *et al.*, 2012]. Eine andere Gruppe konnte bei der Entwicklung von Methoden zur Detektion von Nanopartikeln in komplexen Lebensmittelmatrizes einen unbeabsichtigten Eintrag von Metallpartikeln in Lebensmitteln zeigen. So wird in mehreren Arbeiten über die Detektion von Nano- und Mikropartikeln aus Metallen in Brot und Gebäck berichtet, die vermutlich als unbeabsichtigter Abrieb entstanden sind [Beltrami *et al.*, 2011; Gatti *et al.*, 2008]. Auch über die

Aufnahme und Anreicherung von Nanopartikeln durch Pflanzen können diese in unsere Nahrung gelangen [Rico *et al.*, 2011].

Die Akzeptanz des Verbrauchers gegenüber nanotechnologischen Anwendungen ist im Bereich der Lebensmittel im Vergleich zu anderen Anwendungsgebieten sehr gering [Siegrist *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2008].

1.1.2 Rechtliche Regelungen zu Nanomaterialien

Bisher ist eine weltweit gültige Definition als Rechtsgrundlage für Nanomaterialien nicht gelungen. Allerdings gibt es erste Definitionsversuche, u.a. auf europäischer Ebene. Den aktuellsten Vorschlag legte die Europäische Kommission in ihrer Empfehlung (2011/696/EU) zur Definition von Nanomaterialien vom 18.10.2011 vor. Darin wird Nanomaterial definiert 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 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben". Diese Definition unterscheidet Nanomaterial von Nichtnanomaterial folglich in erster Linie anhand der Größe der Partikel. Dieser Definitionsvorschlag der Kommission findet bereits in nachfolgenden Rechtsetzungsverfahren Anwendung. Jedoch betont die Kommission in ihrer Empfehlung, dass der von ihr vorgelegte Definitionsversuch entwicklungsoffen ist und eine spätere Überprüfung und Anpassung der Definition erforderlich sein könnte [Empfehlung 2011/696/EU]. Grundsätzlich sind europarechtliche Rechtsvorschriften auch auf Nanomaterialien anwendbar, obwohl diese nicht gesondert erwähnt werden [KOM/2008/0366]. Allerdings wird eine schrittweise Überprüfung der europäischen Rechtsvorschriften im Hinblick auf Nanomaterialien und ggf. notwendige Änderungen bestehender Rechtsvorschriften angestrebt [COM/2012/0572].

Rechtliche Bestimmungen speziell zu Nanomaterialien finden sich jedoch bereits in einigen europäischen Rechtsvorschriften. Laut Kosmetikverordnung (Verordnung (EG) Nr. 1223/2009) sind Nanomaterialien in Kosmetika der Kommission elektronisch, mit Angabe von unter anderem der Größe der Partikel, der physikalischen und chemischen Eigenschaften oder des toxikologischen Profils, zu melden. Aus diesen Daten erstellt die Kommission bis zum 11.01.2014 einen öffentlich zugänglichen Katalog aller Nanomaterialien in kosmetischen Mitteln. Zudem ist auf den einzelnen Produkten das verwendete Nanomaterial zu benennen und mit der Bezeichnung „Nano" in Klammern zu versehen [VO (EG) Nr. 1223/2009]. Nach der Biozidverordnung (Verordnung (EU) Nr. 528/2012) bedürfen Nanomaterialien zur Zulassung in Biozidprodukten einer gesonderten Bewertung. Außerdem müssen alle im zugelassenen

Biozidprodukt verwandten Nanomaterialien auf dem Etikett angegeben und mit der Kennzeichnung „Nano“ in Klammern versehen werden [VO (EU) Nr. 528/2012].

Speziell für den Bereich der Lebensmittel ist die *Novel Food* Verordnung (Verordnung (EG) 258/97) von Relevanz. Sie regelt neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, die vor dem 15.05.1997 noch nicht in nennenswertem Umfang in der EU für den menschlichen Verzehr verwendet wurden. Diese müssen vor dem ersten Inverkehrbringen ein Prüfverfahren durchlaufen und genehmigt werden. Nanomaterialien werden darin jedoch bisher nicht explizit erfasst. Die geplante Novellierung der Novel Food Verordnung scheiterte im Jahr 2011 am Widerstand der Mitgliedstaaten der EU, allerdings nicht aufgrund der Einbeziehung von Nanomaterialien in die neue Verordnung. Diese Novelle hätte Lebensmittel, die technisch hergestellte Nanomaterialien enthalten oder aus solchen bestehen, explizit in den Katalog der neuartigen Lebensmittel aufgenommen. Allerdings unterliegen Lebensmittel, welche mit neuen Technologien hergestellt wurden, die Einfluss auf die Zusammensetzung der Lebensmittel und deren Stoffwechsel haben, ohnehin dem Geltungsbereich der *Novel Food* Verordnung [VO (EG) Nr. 258/97]. Die Kennzeichnungspflicht von Inhaltsstoffen in Nanoform wird durch die Lebensmittel-Informationsverordnung (Verordnung (EU) Nr. 1169/2011) festgelegt. Ab Dezember 2014 müssen Nanomaterialien als Zutaten in Lebensmitteln im Zutatenverzeichnis eindeutig aufgeführt und mit „Nano“ gekennzeichnet werden. Eine Definition für technisch hergestelltes Nanomaterial findet sich in Artikel 2 der Verordnung, wobei diese Definition etwas weiter greift als der Vorschlag der Europäischen Kommission, da diese Partikel mit einem Außenmaß größer als 100 nm erfasst, sofern die durch die Nanoskaligkeit bedingten Eigenschaften erhalten bleiben [VO (EU) Nr. 1169/2011]. Diese Definition zielt folglich verstärkt auf die besonderen Eigenschaften von Nanomaterialien ab. Gleichzeitig ist die Definition in der Lebensmittel-Informationsverordnung enger als jene von der Kommission vorgeschlagene, da deren Definitionsvorschlag auch Nanomaterialien erfasst, wenn die Hälfte der Partikel (in Ausnahmefällen auch bis zu 99 % der Partikel) größer sind als 100 nm, ohne dass es auf die besonderen Eigenschaften von Nanomaterialien ankäme.

Für Nanomaterialien, die als Inhaltsstoffe von Lebensmittelkontaktmaterialien aus Kunststoff verwendet werden, gibt es in der Verordnung (EU) Nr. 10/2011 eine Positivliste [VO (EU) Nr. 10/2011]. Auch wenn Nanomaterialien in anderen Rechtsvorschriften, die das Lebensmittelrecht betreffen, noch nicht explizit genannt werden, gilt für sie nach der Basisverordnung (Verordnung (EU) Nr. 178/2002), dass sie nicht in den Verkehr gebracht werden dürfen, wenn ihr Verzehr die menschliche Gesundheit beeinträchtigen kann [VO (EG) Nr. 178/2002].

1.1.3 Einflussfaktoren auf die Toxizität von Nanopartikeln

Grundlage für einen sicheren Umgang mit Nanopartikeln ist deren toxikologische Bewertung. In diesem Abschnitt wird der derzeitige Stand des Wissens zur Toxizität von Nanopartikeln näher beleuchtet.

Schon Paracelsus (1493-1541) schrieb nieder: „Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis machts, dass ein Ding kein Gift sei." [Paracelsus, 1538]. Diese Aussage besagt, dass ab einer bestimmten Dosis alle Stoffe unerwünschte Effekte im menschlichen Stoffwechsel verursachen können. Auch für Nanopartikel gilt, dass die gesundheitliche Beeinträchtigung durch Stoffe fast immer von der Konzentration abhängt, weshalb die Bestimmung einer nicht schädlichen Dosis hier ebenfalls Grundlage für einen sicheren Umgang mit diesen Materialien ist. Zusätzlich kann es für den Umgang mit dem Risiko wichtig sein, den Mechanismus der Wirkung zu verstehen. Im Fall von Nanopartikeln ist jedoch noch unklar, welches die geeignete Konzentrationsangabe ist, um eine toxische Wirkung zu beschreiben [Frewer *et al.*, 2011]. In einigen Versuchen zeigt sich die Partikelmasse oder die Partikeloberfläche als gutes Maß zum Vergleich der Toxizität von Nanopartikeln [Oberdörster *et al.*, 2007]. Bis geklärt ist, welche Maßeinheit die geeignete ist, sollten so viele Informationen wie möglich zu den Partikeleigenschaften angegeben werden (zum Beispiel Partikelform und Größenverteilung, Partikelanzahl, usw.), um eine Vergleichbarkeit der Arbeiten zu ermöglichen [Frewer *et al.*, 2011].

Nanopartikel sind komplexe Strukturen, die sich im Vergleich zu konventionellen, löslichen Chemikalien durch mehrere Eigenschaften auszeichnen, die Einfluss auf das Verhalten und die Toxizität der Partikel haben. Einen unumstrittenen Einfluss auf die Toxizität hat die chemische Zusammensetzung der Nanopartikeln, also das Material aus dem die Partikel bestehen. So zeigt sich zum Beispiel eine deutlich unterschiedliche Zytotoxizität von Nanopartikeln aus Silber und Ceroxid [Gaiser *et al.*, 2012]. Auch Kupferoxidnanopartikel sind toxischer als Titanoxidnanopartikel und diese wiederum toxischer als Zinkoxidnanopartikel [Karlsson *et al.*, 2008].

Neben der chemischen Zusammensetzung ist die Größe der Nanopartikel nicht nur für die Definition eine wichtige Eigenschaft. Goldnanopartikel in einem Größenbereich von 0,8 bis 15 nm zeigen zum Beispiel für 1 bis 2 nm große Partikel die höchste Toxizität [Pan *et al.*, 2007]. Auch die Aufnahme von Polylactid-co-Glycolid Partikeln durch die humane Karzinomzelllinie Caco-2 und durch das Rattendünndarmepithel ist größenabhängig. Die 100 nm Partikel werden schneller aufgenommen als die 1 µm und 10 µm Partikel [Desai *et al.*, 1996; Desai *et al.*, 1997]. Der Vergleich der Toxizität von verschieden großen Silbernanopartikeln auf humanen THP-1 Makrophagen zeigt, dass die kleineren Partikel toxischer sind, wenn sie auf der Basis der Masse vergleichen werden. Wird die Toxizität jedoch auf die Partikeloberfläche

bezogen, sind die Partikel gleich toxisch [Haase *et al.*, 2011]. Für Hämatit-Eisenoxidnanopartikel zeigt sich das Problem der geeigneten Konzentrationsangabe. Die Resorptionsrate durch die humane Karzinomzelllinie Caco-2 ist größenabhängig. Bezogen auf die Masse werden die größeren Partikel stärker resorbiert, während eine Darstellung bezogen auf die Partikelanzahl die Resorptionsrate der kleineren Partikel größer erscheinen lässt [Zhang *et al.*, 2010]. Karlsson *et al.* zeigen hingegen an der humanen Alveolarzellline A549, dass die Toxizität von Nanopartikeln im Vergleich zu Mikropartikeln nicht für jedes Material von der Größe abhängt. So sind Kupferoxidnanopartikel toxischer als die größeren Kupferoxidmikropartikel, Titanoxidnanopartikel verursachen jedoch weniger Schaden als die entsprechenden Mikropartikel und für Eisenoxidpartikel zeigen sich keine klaren Unterschiede [Karlsson *et al.*, 2009]. Eine unterschiedliche Größe kann somit je nach Material zu Unterschieden im toxischen Verhalten führen. Die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung hängen allerdings sehr von der Methode mit der sie bestimmt werden und dem Suspensionsmedium der Partikel ab. Das erschwert den Vergleich verschiedener Arbeiten zusätzlich.

Weiterhin ist die Form von Interesse für die Toxizität. Silberfasern zeigen einen deutlicheren zytotoxischen Effekt als vergleichbare sphärische Partikel, wenn sie auf der Basis des Oberflächeninhalts verglichen werden [Stoehr *et al.*, 2011]. Eine Arbeit zur Aufnahme von Goldnanopartikeln zeigt jedoch, dass sphärische Partikel besser aufgenommen werden als stäbchenförmige. Zudem ist eine maximale Aufnahme bei 50 nm zu beobachten [Chithrani *et al.*, 2006]. Die Toxizität von Kupferoxidnanopartikeln scheint zudem von der Form der Nanopartikel abzuhängen, die jedoch auch Einfluss auf die Ionenfreisetzung hat [Piret *et al.*, 2012].

Die Ionenfreisetzung wiederum hängt von Partikeleigenschaften, wie dem Material, der Größe und der Beschichtung, aber auch von Eigenschaften der umgebenden Lösung ab. Die Freisetzung der Silberionen hängt bei gleicher Partikelart von der Größe der Partikel ab, da sich mit der Größe das relative Verhältnis der Oberfläche zum Volumen ändert. Je kleiner die Partikel sind, desto mehr Ionen werden freigesetzt [Bouwmeester *et al.*, 2011]. So zeigen Versuche mit Silbernanopartikeln unterschiedlicher Größe und Beschichtung an *Caenorhabditis elegans* eine klare lineare Korrelation zur Silberionenfreisetzung [Yang *et al.*, 2012]. Auf die Ionenfreisetzung hat auch der Energieeintrag beim dispergieren der Partikel, zum Beispiel mittels Ultraschall ohne Kühlung, einen Einfluss [Beer *et al.*, 2012].

Neben der chemischen Zusammensetzung und der Geometrie des Partikelkerns ist insbesondere der eingesetzte Stabilisator, der die Oberfläche der einzelnen Partikel bedeckt und diese durch sterische oder elektrostatische Effekte voneinander separiert, ein wichtiges Charakteristikum. Stabilisatoren halten die Stabilität der Nanopartikelsuspension aufrecht und kleiden die Nanopartikel in eine Hülle, die wiederum verschiedene Eigenschaften haben kann.

Der Stabilisator kann locker gebunden und in der Lösung im Überschuss vorhanden oder kovalent an die Partikeloberfläche gebunden sein. Er kann den Partikeln eine hydrophobe, hydrophile, positiv oder negativ geladene Hülle verleihen. So haben Polysaccharid-beschichtete Silbernanopartikel eine etwas stärkere Wirkung auf die Zellviabilität als Kohlenwasserstoff-stabilisierte Partikel mit einer vergleichbaren Größe [Ahamed *et al.*, 2008]. Kohlenstoff-beschichtete Silbernanopartikel haben hingegen weniger Einfluss auf die Zellviabilität als unbeschichtete Silbernanopartikel [Nishanth *et al.*, 2011]. Auch die Aufnahme von Polysterennanopartikeln mit Carbonsäure- oder Amin-funktionalisierter Oberfläche, die zu negativ bzw. positiv geladenen Partikeln im Zellkulturmedium führt, ist größer für die negativ geladenen Nanopartikel als für die positiv geladenen und größer für die kleineren Partikel als für die größeren [Thubagere und Reinhard, 2010]. Die Aufnahme von Polymerpartikeln wird durch die Beschichtung mit den Lectinen WGA und Concanavalin A und einem Enterotoxin von *Escherichia coli* erhöht [Russell-Jones *et al.*, 1999].

Zusätzlich kann das umgebende wässrige Milieu durch seine Zusammensetzung, Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke durch Reduktion der elektrischen Doppelschicht, Anlagerung und Austausch von Stoffen auf der Partikeloberfläche Einfluss auf die Funktionalität, Ladung, Hydrophilie, Aggregation bzw. Agglomeration und Ionenfreisetzung nehmen [Liu und Hurt, 2010; Buettner *et al.*, 2010; Mukherjee und Weaver, 2010]. So resultieren aus dem Zusammenspiel mit der umgebenden Lösung und der Zeit Einflussgrößen wie Agglomeration und Aggregation und eine möglich Proteinkorona [Cedervall *et al.*, 2007]. Aggregate sind Strukturen aus fest gebundenen oder verschmolzenen Primärpartikeln, bei denen die resultierende Oberfläche wesentlich kleiner als die Summe der berechneten Oberflächen der einzelnen Bestandteile sein kann. Ein Aggregat wird durch starke Kräfte zusammengehalten, wie zum Beispiel kovalente Bindungen oder solche, die auf komplexen physikalischen Verhakungen beruhen. Agglomerate hingegen sind Ansammlungen schwach gebundener Primärpartikel und/oder Aggregate, bei denen die resultierende Oberfläche ähnlich der Summe der Oberflächen der einzelnen Bestandteile ist. Ein Agglomerat wird durch schwache Kräfte zusammengehalten, wie zum Beispiel Van-der-Waals-Kräfte, oder einfache physikalische Verhakungen. Agglomerate werden im Gegensatz zu den ursprünglichen Primärpartikeln auch als Sekundärpartikel bezeichnet [DIN CEN ISO/TS 27687, 2008]. Allgemein wird angenommen, dass Aggregation und Agglomeration von Nanopartikeln zu einer verminderten reaktiven Oberfläche und geringer Ionenfreisetzung und damit zu einem geringeren zytotoxischem Effekt führen [Kim und Ryu, 2013]. Obwohl dieser Zusammenhang bereits länger bekannt ist, gehen erst neuere toxikologische Studien ausreichend auf den im Testmedium vorliegenden Zustand der Nanopartikel ein. So zeigt die Untersuchung von Silbernanopartikeln nach Zugabe in das, nach OECD Guideline 211 vorgeschriebene, Medium für die Untersuchung der Toxizität an *Daphnia*

magna, eine starke Aggregation der Partikel [Römer *et al.*, 2011]. Auch der im Wasser gelöste Anteil an Gasen, vor allem an Sauerstoff, kann Einfluss auf das Aggregationsverhalten und die Stabilität von Nanopartikeln haben [Zhang *et al.*, 2011b]. Untersuchungen der antibakteriellen Wirkung von Silbernanopartikeln in Abhängigkeit von der Wasserzusammensetzung zeigen, dass die Wirkung in allen wässrigen Umgebungen vorhanden ist, jedoch durch die Anwesenheit von natürlichem organischem Material und Huminsäuren verringert wird. Die Anwesenheit von divalenten Kationen führt zu einer Reduktion der antibakteriellen Wirkung aufgrund der verstärkten Aggregation und Präzipitation der Partikel [Zhang *et al.*, 2012].

Nanopartikel werden industriell nicht hergestellt, um sich für Toxizitätstest zu eignen. Sie werden großtechnisch meist bei einem nicht-physiologischen pH-Wert verwendet und können mit zytotoxischen Chemikalien stabilisiert sein. Für *in vitro* Assays sollten die Nanopartikel in einer isotonischen Lösung mit einer Protein- und Aminosäuremischung stabil sein. Die im Vergleich zu den meist rein wässrigen Umgebungen in den Stammlösungen von Nanopartikeln deutlich anderen Bedingungen in Zellkulturmedien machen eine erneute Charakterisierung der verwendeten Nanopartikel nötig, um Aussagen über das Aussehen der Partikel im Testsystem machen zu können [Maiorano *et al.*, 2010; Vippola *et al.*, 2009]. Vor allem bei elektrostatisch stabilisierten Nanopartikeln kommt es in Zellkulturmedien, die bei einem pH-Wert von etwa 7 viele Elektrolyte enthalten, zu einem Zusammenbruch der Suspension. In serumhaltigem Medium kann jedoch die Stabilität der Nanopartikel aufgrund der enthaltenen Proteine durch einen sterischen Schutz ersetzt werden [Schulze *et al.*, 2008]. Drescher *et al.* zeigen hingegen, dass die Stabilität und die Toxizität für 3T3 Fibroblasten einer Silikatnanopartikel-Suspension im Zellkulturmedium durch Zugabe von fötalem Kälberserum abnimmt [Drescher *et al.*, 2011]. Die an den Partikeln adhärierenden Proteine (Proteincorona) beeinflussen nicht nur die Stabilität der Nanopartikelsuspension, sondern bilden ein komplexes Interface zwischen Nanopartikeln und biologischen Systemen, das die Interaktion beider beeinflusst [Nel *et al.*, 2009]. So zeigen Proteomics Analysen eine Abhängigkeit der komplexen Zusammensetzung der Proteinkorona von der Größe und Beschichtung der Nanopartikel [Zhang *et al.*, 2011a]. Zudem können sich Veränderungen der Zusammensetzung des umgebenden Milieus, wie zum Beispiel durch die übliche Hitzeinaktivierung von fötalem Kälberserum, auf die Proteincoronazusammensetzung auswirken [Lesniak *et al.*, 2010]. Umgekehrt können die Nanopartikel Einfluss auf die Struktur und Aktivität der Proteine ausüben [Linse *et al.*, 2007]. Die Zusammensetzung der Proteincorona hat Einfluss auf die zelluläre Resorption [Casals *et al.*, 2011]. Weiterhin wird beobachtet, dass es nicht nur Unterschiede in der toxischen Wirkung zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen gibt, sondern auch Unterschiede in der Empfindlichkeit der gewählten Testsysteme. So zeigt die Toxizität von Silbernanopartikeln mit zunehmender Größe der Partikel einen deutlichen Unterschied zwischen den Zelllinien A549, HepG2, MCF-7 und SGC-7901 [Liu *et al.*, 2010b].

Die Untersuchung der Toxizität von Goldnanopartikeln an den humanen Cervixkarzinomzellen HeLa, den humanen Melanomzellen SK-Mel-28, den Fibroblasten L929 und den Makrophagen J774A1 der Maus zeigt verschiedene Arten des Zelltods für die gleichen Nanopartikel, was vermutlich durch Unterschiede im Verhalten und den Ausstattungen der Zelllinien zu begründen ist [Pan *et al.*, 2007]. Missinterpretationen können zusätzlich durch den Einfluss von aus der Synthese verbliebenen Stoffen [Samberg *et al.*, 2011] oder Endotoxin-Kontaminationen entstehen.

Es ist somit festzuhalten, dass die Toxizität von Nanopartikeln von deren Eigenschaften, von den Eigenschaften der umgebenden Flüssigkeit und den Eigenschaften des gewählten Testsystems abhängen (schematisch in Abbildung 2 dargestellt).

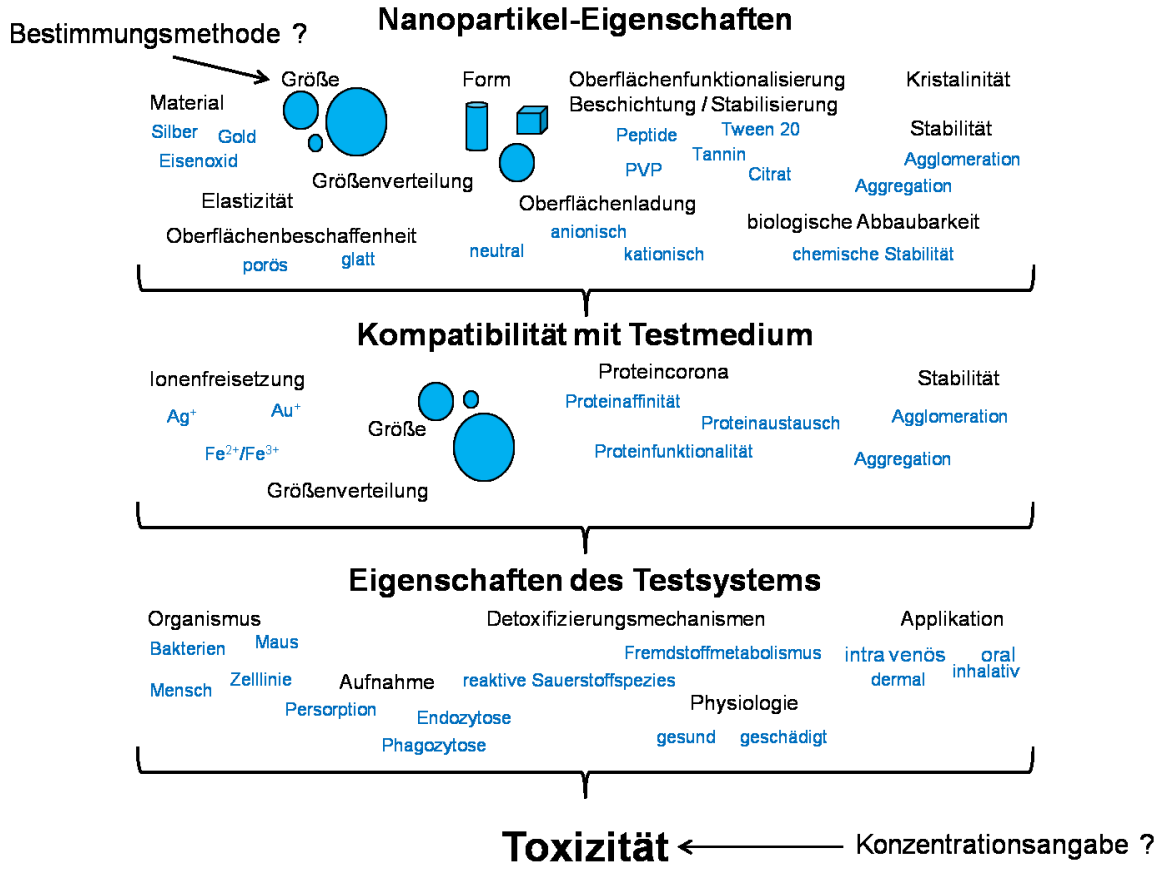

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren auf die Toxizität von Nanopartikeln.

Um eine übergreifende Betrachtung der Toxizität und eine Bewertung von Nanopartikeln zu ermöglichen, sollten die verwendeten Nanopartikel möglichst umfassend in dem verwendeten System charakterisiert werden. Der allgemeine Ansatz zur Risikoabschätzung von Stoffen, die mit dem menschlichen Körper durch Lebensmittel, Kosmetika oder anderen Bedarfsgegenständen in Berührung kommen, beinhaltet eine Gefahrenidentifikation, eine Gefahrencharakterisierung, eine Expositionsabschätzung und die Risikocharakterisierung. Dieser allgemeine Ansatz wird von der

Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) auch als geeignet angesehen, um die Risikobewertung für Nanomaterialien in Lebensmitteln vorzunehmen [EFSA, 2009; EFSA, 2011]. Jedoch bestehen deutliche Wissenslücken bezüglich der Exposition, der Resorption und der Toxizität von Nanomaterialien nach oraler Aufnahme [BfR, 2010; BfR, 2012].

1.2 Silbernanopartikel

Da sich diese Arbeit mit der Untersuchung der Wirkungsweise von Silbernanopartikeln beschäftigt, werden in diesem Abschnitt die Silbernanopartikel ausführlich vorgestellt.

Silber hat eine lange Geschichte als antimikrobielles Agens. Schon antike Gesellschaften verwendeten Silberbehälter zur Lagerung von Wein und Wasser [Duncan, 2011]. Silber wurde noch an Bord der Raumstation MIR und der NASA Space Shuttles zum Trinkwasserrecycling verwendet [Silver, 2003]. Auch die medizinische Anwendung von Silber geht geschichtlich weit zurück. Im Mittelalter wurde Silbernitrat zur Behandlung von nervösen Störungen verwendet. Bei Epilepsie wurde noch bis in das 19. Jahrhundert Silbernitrat verabreicht [Fung und Bowen, 1996]. Aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften von Silber werden Silbernanopartikel heute vor allem im medizinischen Bereich als Desinfektionsmittel, in Wundverbänden und zu Oberflächenbeschichtungen von chirurgischen Instrumenten genutzt [DECHEMA VCI, 2011; Boese, 1921]. Die Anwendung von kolloidalen Silberlösungen im medizinischen Bereich wurde mit dem Aufkommen der Antibiotika geringer, erfährt jedoch im letzten Jahrzehnt aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen eine Renaissance [Rai *et al.*, 2009]. Silbernanopartikel finden sich auch in verbrauchernahen Alltagsprodukten wie Kühlschränken und Putzmitteln sowie in Lebensmittelkontaktmaterialien wie Babyflaschen, Geschirr, Gefrierbeuteln und Dosen [BUND, 2008]. Sie kommen zudem in Form von Nahrungsergänzungsmitteln und als Nahrungszusatz- bzw. Farbstoff (E174) zur Anwendung. Auch heute gibt es noch oral zu applizierende Medikamente, die kolloidales Silber enthalten. Die erste Synthese von Citrat-stabilisierten Silbernanopartikeln wurde bereits vor über 120 Jahren veröffentlicht [Frens und Overbeek, 1969]. Gegenwärtig wird die Produktion von Silbernanopartikeln allein in den USA auf 2,8 bis 20 t/Jahr geschätzt [Hendren *et al.*, 2011].

Silber ist ein xenobiotisches Element mit keinerlei anerkanntem Nutzen als Spurenelement im menschlichen Körper [Lansdown, 2007]. Die Aufnahme mit der Nahrung wird auf 70 bis 90 μg/Tag geschätzt [Wijnhoven *et al.*, 2009]. Der Silbergehalt der Nahrung hängt jedoch regional vom Bodengehalt ab. Mit der normalen Nahrung werden in Großbritannien etwa 27 ± 17 μg/Tag aufgenommen [Hamilton und Minski, 1973]. Zusätzlich zum ubiquitär vorkommenden Silber kann die vermehrte orale Aufnahme unter anderem über den Kontakt von Lebensmitteln mit den reichlich auf dem Markt vorhandenen Lebensmittelkontaktmaterialien mit

Silber- oder Silbernanopartikelbeschichtung erfolgen. So zeigen Migrationsversuche an Lebensmittelkontaktmaterialien aus Polyethylen und Polypropylen eine temperatur- und zeitabhängige Freisetzung von Silber und Silbernanopartikeln [Huang *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011]. Für die Migration von Silber aus Lebensmittelkontaktmaterialien wird von der EFSA aufgrund toxikologischer Aspekte ein spezifischer Migrationsgrenzwert von 0,05 mg/kg festgelegt [BfR, 2010]. In Deutschland darf Silber jedoch laut Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung - ZZulV) zur Konservierung von Trinkwasser nur bei nicht systematischem Gebrauch bis 0,08 mg(Silber)/L sowie für Überzüge von Süßwaren, zur Verzierung von Pralinen und in Likören *quantum satis*[1] eingesetzt werden [ZZulV]. Eine erhöhte orale Aufnahme von nanopartikulärem Silber kann vor allem über eine bewusste Aufnahme von kolloidalen Silbernahrungsergänzungsmitteln, die mit zweifelhaften Heilungsversprechen vor allem über das Internet vertrieben werden, erfolgen [Kühni und von Holst, 2008].

Bevor die Nanopartikel nach oraler Aufnahme in Kontakt mit dem intestinalen Epithel kommen, müssen sie den Gastrointestinaltrakt mit seinen Verdauungssäften überstehen. Dies wird von Walczak *et al.* für Citrat-stabilisierte Silbernanopartikel in einem *in vitro* Verdau betrachtet [Walczak *et al.*, 2012]. Auch die Auswirkungen der in dieser Arbeit verwendeten Silbernanopartikel werden in einem *in vitro* Verdau Modell verfolgt [Böhmert *et al.*, 2013]. Zusätzlich zeigt sich, dass Silbernitrat während des Verdauens unter Anwesenheit von Proteinen Nanopartikel bildet, die neben Silber aus Schwefel und Chlorid bestehen [Walczak *et al.*, 2012]. Dies macht eine Exposition der Intestinalzellen mit Nanopartikeln sehr wahrscheinlich. Die Absorption von Silber im Verdauungstrakt und die damit verbundene systemische Verfügbarkeit werden in mehreren Tierversuchen gezeigt. In einer an Ratten durchgeführten 90 Tage Studie wird nach der Fütterung mit 30 bis 500 mg/kg·Tag Silbernanopartikel im Blut und in allen Organen Silber gefunden. Zudem zeigt sich eine Verfärbung der Intestinalzellen und eine geschlechtsabhängige Anreicherung in der Niere [Kim *et al.*, 2010b]. Eine ebenfalls dosisabhängige Akkumulation von Silber in allen Geweben und ein Geschlechtsunterschied in der Akkumulation von Silber in der Niere, mit der zweifachen Menge in Nieren weiblicher Tiere, kann auch in einer anderen 28 und 90 Tage Studie nach oraler Gabe von Silbernanopartikeln an Ratten gezeigt werden [Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009b]. Eine weitere Rattenstudie über 28 Tage mit PVP-stabilisierten Silbernanopartikeln zeigt im Vergleich zu Silberacetat eine geringere Konzentration an Silber in den Organen sowie eine gleiche Verteilung des Silbers in den Geweben. Die höchsten Silberkonzentrationen werden im Intestinalsystem, der Leber und

[1] *Quantum satis* bedeutet, dass es keine numerische Angabe einer Höchstmenge gibt, sondern der Stoff gemäß der guten Herstellungspraxis nur in der Menge verwendet werden darf, die erforderlich ist, um die gewünschte Wirkung zu erzielen, und unter der Voraussetzung, dass die Verbraucher nicht irre geführt werden [VO (EU) Nr. 1169/2011].

der Niere gefunden. Die für beide Behandlungsgruppen in den Geweben gefundenen Partikel bestanden aus Silber, Selen und Schwefel [Loeschner *et al.*, 2011]. Dies lässt die Vermutung zu, dass Silbernanopartikel nicht in größerem Maße als Partikel aufgenommen werden, sondern vor allem die von ihnen freigesetzten Silberionen. Zum toxischen Mechanismus von Silber ist kaum etwas bekannt und die genaue Wirkungsweise von Silbernanopartikeln wird derzeit erforscht. Eine 28 Tage Studie an Ratten zeigt eine beginnende Leberschädigung bei 1000 mg/kg Silber [Kim *et al.*, 2008]. In *in vitro* Experimenten an eukaryotischen Zellen wird vor allem oxidativer Stress, aber auch eine genotoxische Wirkung sowie die Induktion von Apoptose beobachtet [Ahamed *et al.*, 2010]. Eine Hypothese beschreibt den Mechanismus der Toxizität von Silbernanopartikeln in Makrophagen als Trojanisches Pferd. Silbernanopartikel werden als Depot von Silberionen in die Zelle aufgenommen und in der Zelle ionisiert. Die freigesetzten Silberionen vermitteln dann die Zytotoxizität [Park *et al.*, 2010]. Die Ausscheidung von Silber scheint neben dem renalen Weg vor allem über die Galle zu erfolgen. So wird an Kaninchen die Ausscheidung von Silber nach intravenöser Gabe von Silbernanopartikeln vor allem über die Fäzes beobachtet, was auf eine Sekretion über die Galle schließen lässt [Lee *et al.*, 2012]. Beim Menschen am häufigsten beobachtete Symptome sind nach extensiver Aufnahme von Silberlösungen oder kolloidalem Silber blau-graue Verfärbungen der Haut und Schleimhäute, die besonders an lichtexponierten Stellen deutlich wird. Diese Einlagerung von Silberverbindungen wird als Argyrie bezeichnet [Kim *et al.*, 2009c]. Dabei setzt sich die Verfärbung aus einer blau-grau Färbung durch metallisches Silber, Silbersulfide und Silberselenide und einer Stimulierung der Melanozyten und einer gesteigerten Melaninproduktion zusammen [Fung und Bowen, 1996]. Die permanente Verfärbung der Augen wird als Argyrose bezeichnet [Drake und Hazelwood, 2005]. Lokal begrenzt kann mit intradermalen Gaben von Natriumthiosulfat behandelt werden, großflächige Behandlungen sind jedoch nicht möglich [Fung und Bowen, 1996]. Von weiteren Symptomen, wie zum Beispiel Nervenschädigungen und Allergien gegenüber Silber, wird selten berichtet [Wijnhoven *et al.*, 2009]. Neben der direkten Wirkung auf den menschlichen Körper können stark antibakteriell wirkende Nanomaterialien wie Silbernanopartikel nicht nur unerwünschte Bakterien schädigen, sondern auch Auswirkungen auf nützliche Bakterien haben [Throbäck *et al.*, 2007]. Ihr genauer Wirkungsmechanismus auf Mikroorganismen wird noch heute erforscht. In diesem Zusammenhang ist die meist vertretene Meinung, dass die Wirkung der Silbernanopartikel über freigesetzte Silberionen vermittelt wird. Obwohl der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, scheinen Silber und Silbernanopartikel eine Vielzahl an biologischen Prozessen in Bakterien zu inhibieren [Frewer *et al.*, 2011]. So reagieren Silberionen mit dem Peptidoglykan der Zellwand von Bakterien und deren Plasmamembran und führen zur Zelllyse [Shrivastava *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010]. Es wird auch die Interaktion mit Thiolgruppen in Proteinen beobachtet, was zu einer Inaktivierung von Enzymen führt [Feng *et al.*, 2000]. Auf diese Art und Weise führen Silberionen wahrscheinlich zu einer Abkoppelung der

Atmungskette von der ATP-Synthese, wobei als Angriffspunkt die NADH-Dehydrogenase angenommen wird [Holt und Bard, 2005; Li *et al.*, 2010]. Die Inaktivierung von Enzymen der Atmungskette führt zu einer Produktion an Superoxidradikalen, die zusätzlich zum Sterben von Bakterien beitragen [Park *et al.*, 2009]. Silberionen interagieren zudem mit den Ribosomen und inhibieren so die Expression von Enzymen [Yamanaka *et al.*, 2005]. Außerdem wird beobachtet, dass Silberionen zu einer Kondensation der DNA führen, wodurch die Replikation verhindert wird [Feng *et al.*, 2000]. Der Unterschied in der Sensitivität von eukaryotischen Zellen gegenüber Silber im Vergleich zu prokaryotischen Zellen wird mit den komplexeren Strukturen und Funktionen sowie der Größe der Zellen erklärt [Wijnhoven *et al.*, 2009].

1.3 Die gastrointestinale Barriere

Die Aufnahme und Wirkung der im vorherigen Abschnitt betrachteten Silbernanopartikel wird in dieser Arbeit über den Weg des Magen-Darm-Trakts und der gastrointestinalen Barriere modellhaft untersucht. Einen Überblick über den Aufbau des menschlichen Darms und deren Funktion sowie die Aufnahme von Nanopartikeln gibt dieser Abschnitt.

Der Gastrointestinale Trakt ist für die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus den verzehrten Lebensmitteln zuständig. Lebensmittel bestehen aus einer sehr großen Bandbreite an makromolekularen Strukturen und Matrices, die neben Nährstoffen auch unverdauliche und schädliche Stoffe sowie pathogene Mikroorganismen oder Kontaminanten enthalten können. Im gastrointestinalen Trakt werden die Nährstoffe für eine optimale Aufnahme vorbereitet und resorbiert und gleichzeitig das Eindringen unerwünschter Stoffe verhindert. Dafür gelangen oral aufgenommene Stoffe durch die Speiseröhre in den Magen, der zur Bekämpfung unerwünschter Mikroorganismen ein saures Milieu aufweist. Von dort gelangt der Speisebrei durch peristaltische Bewegungen in Portionen in den Dünndarm, in dem der wesentliche Anteil der Verdauungs- und Resorptionsprozesse stattfindet. Dieser unterteilt sich in mehrere Segmente: Duodenum, Jejunum, Ileum. Nach dem Eintritt des Speisebreis in den Dünndarm wird dieser durch pankreatische Bikarbonatsekretion auf einen neutralen pH-Wert von 6,6 bis 7,5 gebracht [Rehner und Daniel, 2010; Evans *et al.*, 1988].

Der gesamte Dünndarm eines erwachsenen Menschen ist etwa 6 bis 8 m lang und aus mehreren schlauchartigen Gewebsschichten aufgebaut. Die Stabilität und peristaltische Bewegung wird durch die Längs- und Ringmuskelschicht gewährleistet. Durchzogen werden die Schichten von einem dichten Geflecht an Lymphgefäßen, Nerven und Blutgefäßen, die bis in die Darmzotten reichen. Die innere Oberfläche wird im Vergleich zur äußeren durch mehrere Faktoren erheblich vergrößert. Wie in Abbildung 3 dargestellt, wird die Schleimhaut in Kerckring`sche Falten gelegt, die fingerförmige Ausstülpungen aufweisen, die sogenannten

Darmzotten oder Villi. Die so gefaltete Darmschleimhaut (Mucosa) bildet eine Schicht aus Epithelzellen, die einen Bürstensaum aus Mikrovilli tragen, was ihre Oberfläche noch einmal vergrößert. Insgesamt ergibt sich eine innere Oberfläche von 300 bis 400 m^2, jedoch nimmt die Ausprägung der Strukturen und somit die Kontaktfläche zum Darminhalt entlang des Dünndarms zum Ende hin ab [Rehner und Daniel, 2010].

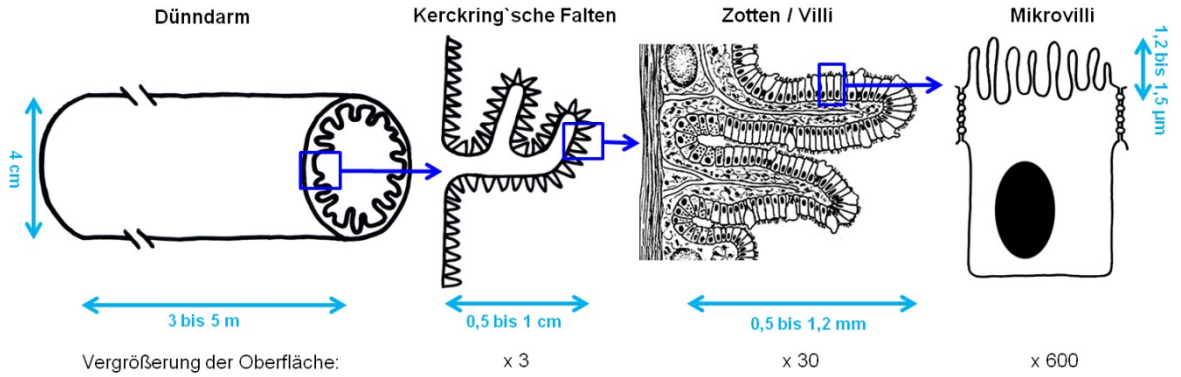

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Oberflächenvergrößerung der Dünndarminnenwand durch Kerckring`sche Falten, Zotten und Mikrovilli [modifiziert nach Ikonen, 2008; Rehner und Daniel, 2010; histonet2000.de, 2013; dreluso.de, 2013].

Das Dünndarmepithel ist einem ständigen Umbau unterworfen. In den unteren Enden der Darmzotten, den Kryptenregionen, befindet sich die Proliferationszone des Epithels mit den Stammzellen. Im Bereich des Ileums erneuert sich die Mucosaoberfläche alle 3 bis 4 Tage und im Bereich des Duodenums alle 5 bis 6 Tage [Rehner und Daniel, 2010]. Dabei bringen die Stammzellen an der Basis der Krypten Progenitorzellen hervor, die sich durch schnelle Proliferation vermehren, bevor sie in den Zellzyklusarrest gehen und differenzieren. Auf ihrem Weg entlang der Kryptenachse in Richtung Zottenspitze zur luminalen Oberfläche durchlaufen die Zellen eine umfangreiche Differenzierung und bilden die vier Zelltypen des Epithels: absorptive Zellen, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Panethzellen [Mariadason *et al.*, 2002]. An der Spitze der Zotten, der Extrusionszone, unterliegen die reifen Enterozyten dem Zelltod durch Apoptose und werden in das Darmlumen abgestoßen. Für diese permanente Regeneration der Zellen bedarf es einer Vielzahl von Steuerungssignalen. Unter anderem sind daran Peptidwachstumsfaktoren wie EGF und TGF, aber auch gastrointestinale Hormone beteiligt [Rehner und Daniel, 2010].

Das Dünndarmepithel besteht aus einer Schicht polarisierter Zellen. Jede Zelle hat zwei unterschiedliche Oberflächen: eine apikale Seite, die zum Darmlumen gerichtet ist, und eine basolaterale Seite, die zum Köperinneren gerichtet ist. Die einzelnen Nachbarzellen sind durch enge Kontakte, den sogenannten *Tight Junctions*, zu einer durchgehenden Schicht verbunden. Die absorptiven Enterozyten resorbieren Wasser, kleinmolekulare Nahrungsbestandteile wie Zucker,

Aminosäuren, Fette und Vitamine, Ionen, wie Natrium, Magnesium und Calcium, aber auch Gallensäuren [Rehner und Daniel, 2010]. Die Becherzellen, Gobletzellen genannt, sind verantwortlich für die Synthese und Sekretion von hochmolekularen Mucinglykoproteinen, die als Schmiermittel und wahrscheinlich auch als Barriere gegen Pathogene und Toxine wirken [Phillips und Frisch, 1990]. Enteroendokrine Zellen produzieren Hormone, die in das Blut abgegeben werden und zur Regulation der Nahrungsaufnahme beitragen [Elder *et al.*, 2009]. Die Panethzellen, die sich vor allem im Bereich der Krypte befinden, sezernieren bakterizide Peptide in das Darmlumen, die als Bestandteil des angeborenen Immunsystems zur Kontrolle der Darmflora beitragen [Ouellette und Bevins, 2001].

Die Darmschleimhaut ist die größte Kontaktfläche des menschlichen Körpers zur äußeren Welt. Sie hat zwei wesentliche Aufgaben. Zum einen ist sie eine immunologische Barriere und zum anderen eine metabolische Barriere. Ersteres wird durch das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) realisiert. Das GALT spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und besteht aus einer Vielzahl von Lymphfollikeln, die unterhalb des Epithels in Gruppen angeordnet sind, die als Peyer'sche Plaques bezeichnet werden [Gärtner, 2002]. Diese werden vom Follikel-assoziierten Epithel (FAE) bedeckt, einer einschichtigen Lage aus Enterozyten, in der verteilt sogenannte M-Zellen (abgeleitet von *microfolds*) zu finden sind. M-Zellen sind hoch spezialisierte Epithelzellen, die für den Transport von Antigenen, Bakterien, Viren und Partikeln zu den antigenpräsentierenden Zellen unter dem Darmepithel, als erster Schritt einer möglichen Immunantwort, verantwortlich sind [Lo *et al.*, 2004]. Sie unterscheiden sich vom restlichen Epithel durch die Abwesenheit von Mikrovilli und durch eine reduzierte Expression von Verdauungsenzymen. Ihre Bildung aus absorptiven Enterozyten wird durch den Kontakt mit Lymphozyten reversibel induziert. Sie sind auf den transepithelialen Transport von Antigenen spezialisiert, die sie endo- bzw. phagozytotisch aufnehmen und zu basolateral lokalisierten Lymphozyten oder dendritischen Zellen leiten können. So tragen sie als Teil des GALT dazu bei, dass das intestinale Epithel die Darmflora tolerieren und gleichzeitig für eine effektive lokale Immunität gegen Pathogene und ihre Toxine sorgen kann [Gärtner, 2002]. Sie machen nur etwa 0,1 % der gesamten Intestinalzellen und 10 bis 20 % der Zellpopulation im FAE aus [Pielage *et al.*, 2007].

1.3.1 Die intestinale Aufnahme von Nanopartikeln

Die Aufnahme von Nanopartikeln nach oraler Verabreichung setzt voraus, dass es zuvor im Gastrointestinaltrakt nicht zur Aggregation der Partikel kommt. Auch die Schleimschicht (Mucus), welche die Enterozyten schützend überzieht, ist für die Aufnahme der Partikel von Bedeutung, da das Eindringen der Partikel in den Mucus neben der Größe von der

Oberflächenmodifikation der Partikel abhängt. Szentkuti *et al.* beobachten zum Beispiel in einer Studie an Ratten, dass kationisierte Latex-Nanopartikel vom negativ geladenen Mucus eingefangen werden, während carboxylierte Latex-Nanopartikel durch Diffusion aufgenommen werden [Szentkuti und Enss, 1998]. Lange Zeit wurde jedoch davon ausgegangen, dass der gastrointestinale Trakt eine unüberwindliche Barriere für Partikel darstellt [Florence, 1997]. Unterschieden werden können, wie in Abbildung 4 dargestellt, folgende Wege der Partikelaufnahme: 1. die Aufnahme über den parazellulären Weg, wobei in 1a. die Persorption in der Extrusionszone und 1b. die parazellulären Passage durch *Tight Junctions* weiter unterteilt werden kann; 2. der intrazellulären Aufnahme und den Transport über Epithelzellen, wobei in 2a. die Diffusion durch die Enterozyten, 2b. die absorptive Endozytose der Enterozyten und 2c. die rezeptorvermittelte Endozytose der Enterozyten unterteilt werden kann; und 3. der lymphatischen Aufnahme durch Transzytose über die M-Zellen der Peyer´schen Plaques [Florence, 1997; Jahn *et al.*, 2012].

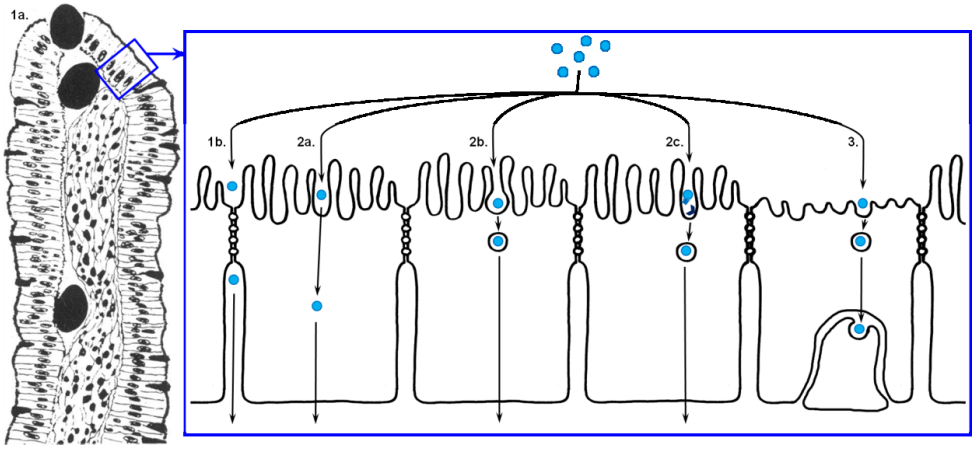

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufnahmewege von Partikeln im intestinalen Epithel. 1a. Persorption durch die Extrusionszone der Villi, 1b. parazelluläre Passage durch die *Tight Junctions*, 2a. Diffusion durch die Enterozyten, 2b. adsorptive Endozytose der Enterozyten, 2c. rezeptorvermittelte Endozytose der Enterozyten und 3. Endozytose in den M-Zellen dargestellt [modifiziert nach Volkheimer, 1974; Jahn *et al.*, 2012; Ikonen, 2008].

Schon 1974 zeigte Volkheimer den Mechanismus der Persorption von mikrometergroßen Stärkekörnern im Darm von verschiedenen Tieren [Volkheimer, 1974]. Dabei erfolgt die Aufnahme im Wesentlichen durch die Epithelzellschicht an den Stellen, an denen sterbende Enterozyten in das Darmlumen abgestoßen werden. Dies kann auch für kolloidale Goldpartikel in Mäusen gezeigt werden [Hillyer und Albrecht, 2001]. Dieser Aufnahmeweg scheint unabhängig von der Partikelgröße zu sein, wird jedoch als relativ ineffektiver Mechanismus bezüglich der Aufnahme angesehen [Powell *et al.*, 2010]. Eine weitere Möglichkeit der parazellulären Aufnahme ist der Weg zwischen den Zellen hindurch, für den die Partikel Lücken in den *Tight Junctions* nutzen [Frewer *et al.*, 2011]. Im gesunden Darm ist dieser Weg ein eher theoretischer, da die *Tight*

Junctions eine sehr effektive Barriere für die Partikelaufnahme darstellen, wenn sie nicht durch Entzündungsprozesse geschwächt wird. Die Endozytose der Partikel durch Enterozyten oder M-Zellen kann durch einen unspezifischen Kontakt der Partikel mit den Zellen oder gezielte Rezeptorbindung vermittelt werden. Partikel, die diesem Aufnahmeweg folgen, sind meist kleiner als 100 nm. In M-Zellen werden die Partikel mittels Transzytose durch die Zelle transportiert und basal exozytiert [Powell *et al.*, 2010]. Die Endosomen in M-Zellen umgehen die in anderen Zelltypen übliche Fusion mit Lysosomen, so dass in M-Zellen kein Abbau der eingeschlossenen Strukturen (*in vivo* in der Regel komplexe Antigene) stattfindet [Owen *et al.*, 1986]. Diese Aufnahme wird für große Nanopartikel und kleine Mikropartikel von 20 bis 500 nm gezeigt [Powell *et al.*, 2010].

1.3.2 Zelluläre Modelle der intestinalen Barriere

Caco-2 Zellen wurden erstmals 1974 durch Fogh isoliert und stammen ursprünglich aus dem menschlichen Colonkarzinom eines kaukasischen Mannes [Fogh *et al.*, 1977]. Die immortalen Adenokarzinomzellen sind heutzutage ein gut etabliertes Modell der epithelialen Aufnahme von Stoffen und dienen sowohl der pharmazeutischen Industrie zum Screening der Resorption von Arzneistoffen als auch der Forschung für Resorptionsstudien von Xenobiotika und der Aufklärung von molekularen Mechanismen [Hubatsch *et al.*, 2007; Lampen *et al.*, 2004]. Die Zellen wachsen als Monolayer, differenzieren spontan nach Erreichen des konfluenten Zustandes zu einem dünndarmähnlichen Epithel und zeigen sowohl phänotypische, morphologische sowie funktionelle Eigenschaften ausgereifter Enterozyten des Dünndarmepithels. Die Resorption von Stoffen durch differenzierte Caco-2 Zellen zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Resorption von Stoffen durch die Mucosa *in vivo* [Artursson und Karlsson, 1991; Hidalgo *et al.*, 1989; Artursson, 1990]. Sie zeigen eine zylindrisch polarisierte Morphologie mit dem typischen Bürstensaum (Mikrovilli), wie auch *Gap* und *Tight Junctions* und Desmosomen. Durch die *Tight Junctions* wird die apikale Zellmembran vom basolateralen Membranbereich räumlich getrennt [Chantret *et al.*, 1988]. Dabei unterbinden die *Tight Junctions* das freie Driften von Membranproteinen in der Membranebene und vermindern den passiven, transzellulären Transport von Substanzen. Differenzierte Caco-2 Zellen exprimieren verschiedene Enzyme, wie zum Beispiel die als Differenzierungsmarker genutzten Hydrolasen Sucrase-Isomaltase und alkalische Phosphatase, die Phase I Enzyme Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen (CYPs) und die Phase II Enzyme Sulfotransferasen (SULTs), Glutathion-S-Transferasen (GSTs) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) sowie Transportproteine wie zum Beispiel die *Multidrug resistance-associated proteins* (MRPs) [Sun *et al.*, 2008; Chantret *et al.*, 1988]. Außerdem finden sich auf Caco-2 Zellen diverse Nährstofftransporter, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sowie Moleküle die in die Zelladhäsion und –migration involviert sind [Sun *et al.*, 2002]. Sie bieten

daher den Vorteil mit menschlichem statt mit tierischem Gewebe arbeiten zu können und liefern durch ihre kontinuierliche Teilungsfähigkeit einen ständig verfügbaren Vorrat an gleichartigen Zellen. Ein Caco-2 Monolayer repräsentiert nicht den Dünndarm, sondern lediglich die resorbierenden Zellen des Dünndarms. Im Vergleich zum humanen Dünndarmepithel verfügt ein Caco-2 Monolayer über dichtere *Tight Junctions*, auch variieren die Eigenschaften der Zellen mit den Kulturbedingungen in den verschiedenen Laboratorien [Behrens und Kissel, 2003; Shah *et al.*, 2006]. Caco-2 Zellen sind nicht in der Lage eine für die Dünndarmmucosa charakteristische Mucusschicht sowie die auf Partikelaufnahme spezialisierten M-Zellen zu bilden. Diese Eigenschaften können jedoch durch geeignete Cokultursysteme ergänzt werden. Zur Ergänzung des Caco-2 Modells durch eine Mucusschicht wird häufig eine Cokultur mit HT-29 Zellen gewählt. Diese Zelllinie stammt ebenfalls aus einem humanen Colonkarzinom [von Kleist *et al.*, 1975]. Einzelne Subklone weisen eine deutliche Mucussekretion auf und werden daher zusammen mit Caco-2 Zellen kultiviert [Walter *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2010]. Diese Cokultur ist von Interesse für die Untersuchung von Nanopartikeln, da der Mucus vor allem für hydrophobe Partikel eine Barriere darstellt [Behrens *et al.*, 2002]. Die Transformation von absorptiven Enterozyten zu M-Zellen kann durch Cokultur von Caco-2 Zellen mit Lymphozyten im Transwell®-System erzeugt werden. Die durch Caco-2 Zellen in Monokultur repräsentierten Dünndarmenterozyten, die etwa 90 % der Oberfläche des Dünndarmepithels ausmachen, werden so um Funktionalitäten erweitert, deren Einfluss für die Aufnahme von Nanopartikeln wesentlich sind. Dieses *in vitro* Modell wurde erstmalig von Kerneis *et al.* zur Verfolgung bakterieller Infektionen im Darm beschrieben [Kernéis *et al.*, 1997]. Dabei wurde die Konversion absorptiver Caco-2 Zellen in M-Zellen zunächst durch primäre Lymphozyten aus den Peyer'schen Plaques von Mäusen bzw. durch primäre humane Blutlymphozyten erreicht [Tyrer *et al.*, 2002; Kernéis *et al.*, 1997]. Wegen der geringen Überlebensrate primärer Lymphozyten wurden diese von Gullberg *et al.* durch Raji Lymphozyten, eine humane Burkitt Lymphomzelllinie, ersetzt [Gullberg *et al.*, 2000]. Die Transporteigenschaften des Modells werden mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Latexpartikel (20 bis 200 nm) charakterisiert, was die Eignung des Systems zur Charakterisierung der intestinalen Aufnahme von Nanopartikeln dokumentiert [Kernéis *et al.*, 2000]. Daher steht die Aufnahme von Partikeln und Proteinen über M-Zellen im besonderen Fokus von Forschungsarbeiten, in denen Nanopartikel als Träger für oral applizierbare Impfstoffe entwickelt werden sollen.

2 Zielstellung

Synthetische Nanomaterialien werden zunehmend im Lebensmittelsektor eingesetzt und gelangen damit in unsere Nahrung. In diesem Zusammenhang ist eine Risikobewertung wichtig für eine sichere Verwendung neuer Materialien. Den Ausschlag zur Untersuchung von Nanopartikeln im Rahmen dieser Arbeit gab eine Stellungnahme der EFSA die sich aufgrund von Datenlücken nicht in der Lage sah, die Bewertung von kolloidalem Silber als Nahrungsergänzungsmittel vorzunehmen [EFSA, 2008]. Zusätzlich ermöglicht die Kooperation mit der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) die Verwendung von gut charakterisierten Partikeln, was entscheidend für eine brauchbare Aussage zur Toxizität solcher Materialien ist.

In Tierversuchen zeigt sich eine systemische Verteilung von Silber nach oraler Gabe von Silbernanopartikeln in allen Organen [Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010b]. Der genaue Aufnahmemechanismus über die gastrointestinale Barriere ist jedoch noch unklar. Zur Beantwortung der Frage **1) Werden Silbernanopartikel von Intestinalzellen resorbiert?** bedarf es weiterer Untersuchungen zum Thema der oralen Aufnahme von Silber in Form von Ionen und Nanopartikeln. Die Untersuchung der Aufnahmemechanismen soll anhand eines ausgewählten Silbernanopartikels in dem *in vitro* Modell der Darmbarriere Caco-2 erfolgen.

Des Weiteren scheint die Toxizität von Nanopartikeln von mehreren Faktoren abzuhängen. So konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass zum Beispiel die Größe der Nanopartikel einen Einfluss auf deren Toxizität hat [Liu *et al.*, 2010b]. Zur weiteren Klärung der Frage **2) Welche Faktoren beeinflussen die Zytotoxizität von Silbernanopartikeln?** sollen in dieser Arbeit anhand einfacher Zytotoxizitätsmessungen weitere Faktoren wie zum Beispiel die Beschichtung der Nanopartikel, die Ionenfreisetzung oder Eigenschaften des Testsystems wie die Zelllinie oder die Zusammensetzung des Zellkulturmediums untersucht werden.

Eine weitere Fragestellung betrifft den zellulären Mechanismus der Toxizität von Silber. In diesem Zusammenhang sind bisher vor allem reaktive Sauerstoffspezies und Apoptose im Fokus [Gopinath *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2009a]. Zudem ist umstritten, ob die nanopartikuläre Form einen Beitrag zur Toxizität leistet oder ob die Toxizität ausschließlich von den freigesetzten Ionen vermittelt wird [Beer *et al.*, 2012]. Um einen Schritt auf dem Weg zur Beantwortung dieser Fragen **3) Hat die nanopartikuläre Form einen Einfluss oder wird die Wirkung der Nanopartikel ausschließlich durch die freigesetzten Ionen vermittelt?** und **Welche Wirkung haben Silbernanopartikel auf Enterozyten?** zu gehen, soll in der hier vorliegenden Arbeit die zytotoxische Wirkung von Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln im humanen Enterozytenmodell Caco-2 untersucht werden. Dafür sollen neben verschiedenen Assays im 96-*well* Format Informationen aus einer Micro-Array-Analyse und PCR-Analysen genutzt werden, um Hypothesen zum Mechanismus der Toxizität von Silbernanopartikeln zu generieren.

3 Material

3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die in der folgenden Liste nicht aufgeführt sind, wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

1-Methyl-5-nadican-2,3-dicarbonsäureanhydrid	Carl Roth, Karlsruhe
2,4,6-Tri(dimethylaminomethl)-phenol	Carl Roth, Karlsruhe
2-Dodecenylbernsteinsäureanhydrid	Carl Roth, Karlsruhe
7-AAD Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix	Abgene, Hamburg
Annexin V-FITC	Immuno Tools, Friesoythe
Cacodylsäurenatriumsalz Trihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleotide (je 2,5 mM)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
DNAse	Qiagen, Hilden
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit L-Glu und Na-Pyruvat	PAA, Cölbe
Ethanol	Merck, Darmstadt
FluoSpheres®, carboxylierte dark red (660/680) Polysterol-Latex-Nanopartikel (200 nm)	Invitrogen, Darmstadt
Formaldehyd (37 %ig)	Merck KGaA, Darmstadt
fötales Kälberserum (fetal calf serum)	PAA, Cölbe
Glycidether 100	Merck, Darmstadt
Immersionsöl Typ F	Leica Microsystems, Wetzlar
ITS-Supplement (100x)	PAA, Cölbe
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Roche, Mannheim
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
Random Hexamer Primer	Applied Biosystems, Darmstadt
Reverse Transkriptase (M-MLV) mit Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
RNAse Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt
RNAseZAP	Invitrogen, Darmstadt
TaqMan RT Buffer (10x)	Applied Biosystems, Darmstadt
Trypsin-EDTA Lösung	PAA, Cölbe
Tween 20 Detergent	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser (RNAse/DNAse frei)	Merck, Darmstadt
Vectashield	Biozol, Eching

3.2 Kits und Verbrauchsmaterialien

BM Cyclin	Roche, Mannheim
Calcium-Assay-Kit (Fluo-8 NW)	AAT Bioquest, Sunnyvale
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Madison
Cell Mask™ Orange Plasma Membran Stain	Invitrogen, Darmstadt
Cell Meter™ JC-10 Mitochondria Membrane Potential Assay	AAT Bioquest, Sunnyvale
CellTiter-Blue® - Cell Viability Assay	Promega, Madison
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen, Darmstadt
Deckgläschen	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Dialysemembran: MWCO 15000, flat width 45 mm, diameter 29 mm, Regenerated Cellulosis	Spectrum Lams, Breda
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Erembodegen
GSH/GSSG-Glo™ Assay	Promega, Madison
Image-iT® LIVE Green Caspase-3 and -7 Detection Kit	Invitrogen, Darmstadt
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen: Cryos Tube™ Vials	Nunc A/S, Kamstrupvej
Kühlschrank: +5 / -20 °C Comfort NoFrost	Liebherr, Lienz
Kühlschrank: -80 °C VIP™ Series	Sanyo, San Diego
Micro-Array: Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0	Affymetrix, Santa Clara
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Amboise
Objektträger	VWR international, Darmstadt
Parafilm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pasteurpipetten VOLAC®	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Periodic Acid-Schiff (PAS) Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pipettenspitzen: 10, 100, 200, 300, 1000 µL	VWR international, Darmstadt
Pipettenspitzen: Combitips® plus	Eppendorf, Hamburg
Reagenzreservoirs, steril	VWR, West Chester
Reaktionsgefäße: (Eppendorfgefäße) 0,5-5 mL	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße: (Falcons) 15 mL und 50 mL	Fischerbrand, Schwerte
Reaktionsplatten: MicroAmp Optical 96-*well* Reaction Plate	Invitrogen, Darmstadt
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
RT² First Strand Kit	SA Biosciences, Hilden
RT² Profiler™ PCR Array: CAPH10676 Custom Array	SA Biosciences, Hilden
Screen Quest™ Fluo-8 Medium Removal Calcium Assay	AAT Bioquest, Sunnyvale
Silikonschlauch	Neolab, Heidelberg
Skalpell	Neolab, Heidelberg
Spritze: 1, 5 und 10 mL	Braun, Melsungen
Sterilfilter: 25 mm, 0,2 µm	GE Healthcare, Solingen
Zählkammer C-Chip Neubauer	Hennberg-Sander, Gießen
Zellkulturflaschen 25 cm^2 und 75 cm^2	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten: 6-, 12-, 24-, 48-, 96-*well* Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten: 96-*well* Platte mit Goldwiderstand (E-Plate)	ACEA, San Diego
Zellkulturplatten: Transwell®-Platten	Corning, Kaiserslautern
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen

3.3 Geräte

96-*well*-Plattenmessgerät: Mithras LB940	Berthold Technologies, Wien
Absaugpumpe	Neolab, Heidelberg
CO_2-Inkubator Heracell 240	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer: FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Einfriercontainer „Mr. Frosty“	Nalgene, Hanau
Hochdruckmikrowelle: ETHOS	MLS, Leutkirch
Maßkolben aus PFA, 10 mL	VWR, Dresden
Mikoelektrophorese: Bioanalyzer	Agilent Technologies, Wallbronn
Mikroskop: Fluoreszenzmikoskop Axio Observer	Zeiss, Göttingen
Mikroskop: Konfokales Laserscanning Mikroskop SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop: Lichtmikroskop Motic AE20	Motic, Wetzlar
Mikroskop: Rasterelektronenmikroskop DSM 982 GEMINI	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop: Transmissionselektronenmikroskop 10 CR	Zeiss, Göttingen
Mikroskop: Transmissionselektronenmikroskop mit EDX Tecnai G20 S-TWIN	FEI, Hillsboro
PCR-Thermocycler: 7900HT Fast Real-time PCR-System	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR-Thermocycler: GeneAmp 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR-Thermocycler: MX3005™ QPCR	Stratagene, Amsterdam
PCR-Werkbank	Heto-Holten, Allerod
Pipette: Einkanalpipetten 0,5-2.500 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette: Mehrkanalpipetten (8-/ 12-Kanal), 30-300 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette: Messpipetten 5-20 mL	Brand, Wertheim
Pipette: Multipipette Xstream	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe: Easypet	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage: MilliQ Reference A+	Millipore, Billerica
Säurewäscher: Dampfreiniger traceCLEAN	MLS, Leutkirch
Spectrophotometer: NanoDrop™ 1000	Thermo Scientific, Steinfurt
Sterilwerkbank: Herasafe	Thermo scientific, Langenselbold
Sterilwerkbank: Nuaire	Nuaire, Plymouth
Ultramikrotom: Reichert Ultracut S	Leica Microsystems, Wetzlar
Ultraschallbad: Souorex RK 100 Transistor	Bandelin electronic, Berlin
Volt-Ohm-Meter: EVOM	World Precision Instruments, Sarasota
Vortexer VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
Waage: Analysenwaage MC210S	Sartorius, Göttingen
Waage: Oberschalwaage Sartorius	VWR International, Darmstadt
Wasserbad	GFL, Burgwedel
xCelligence RTCA	Roche, Mannheim
Zentrifuge: Digitale Mikrozentrifuge Galaxy 14D	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge: Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Multifuge 3SR+	Heraeus, Hanau
Zentrifuge: Ultrazentrifuge Optima™ TLX Rotor TLA 55	Beckman, Unterschleissheim-Lohhof

4 Methoden

4.1 Charakterisierung der Silbernanopartikel

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, unterscheiden sich Nanopartikel von den meisten konventionellen Chemikalien, die sich durch ihre chemische Struktur, Löslichkeit und Konzentration auszeichnen, durch weitere spezifische Eigenschaften, wie die Größe und Größenverteilung, die Form, die Oberflächenbeschaffenheit und andere. Es ist wichtig, für die Interpretation der toxikologischen Daten möglichst viele Eigenschaften zu kennen. Dabei hängt jedoch die angegebene Partikelgröße auch von der Methode ab, mit der sie bestimmt wird [Hassellöv *et al.*, 2008]. Daher sollte diese für ein besseres Verständnis und zur Vermeidung von Missverständnissen immer mit der Größenangabe zusammen genannt werden. Die Informationen zur Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel sind hier im Folgenden dargestellt und in Tabelle 1, Seite 28 zusammengefasst. Bei den aufgeführten Daten zur Charakterisierung handelt es sich nicht um eigene Daten, sondern, wenn nicht mit anderen Quellen gekennzeichnet, um Daten aus den Promotionsarbeiten von Herrn **Ulf Hansen** und Herrn **Matthias Girod**. Anwendung zur Charakterisierung der Nanopartikel fanden die Transmissionselektronenmikroskopie (*Transmission Elektron Microskopy*, TEM) mit einem energiedispersiven Röntgenspektrometer (*Energy Dispersiv X-ray spectrometer*, EDX), die Röntgenkleinwinkelstreuung (*Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS), die dynamische Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering*, DLS) sowie zur Trennung die asymmetrische Fluss Feldfluss Fraktionierung (*Asymmetric Flow Field-Flow Fractionaton*, A4F).

In dieser Arbeit wurden vorrangig **Tensid-stabilisierte Silbernanopartikel**, die vom Hersteller rent a scientist GmbH entwickelt und von ras materials GmbH als **AgPURE™** für die Beschichtung von Oberflächen und Textilien vertrieben werden, verwendet. Ausgewählte Chargen dieser Nanopartikel wurden vom *Joint Research Centre* (JRC), der Europäischen Kommission als Referenzmaterial NM300 [Klein *et al.*, 2011] und von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) als Referenzmaterial BAM-N001 [BAM, 2013] ausführlich charakterisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Charge der Tensid-stabilisierten Silbernanopartikel stammt ebenfalls von der BAM und wurde dort charakterisiert. Bei den Partikeln handelte es sich um sphärische Silbernanopartikel mit einem Metallkerndurchmesser von etwa 13,84 ± 0,03 nm (SAXS) und einem hydrodynamischen Durchmesser in der wässrigen Stammlösung von 29,4 ± 0,4 nm (DLS). Sie waren mit 4 % (w/v) Polysorbat 20 (Handelsname Tween 20) und 4 % (w/v) Polyoxyetylen Glycerol Trioleat (Handelsname Tagat® TO) [Hensel *et al.*, 1997] stabilisiert. Ihr Zetapotenzial betrug -30 mV. Vor der weiteren Verdünnung mit Zellkulturmedium wurden die Partikel 1:100 in bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Partikel waren mindestens bis 48 h stabil in serumhaltigem Zellkulturmedium. Sie bildeten eine Proteincorona, die aus BSA (*bovine serum albumin*,

Rinderserumalbumin), LENG1 (*leukocyte receptor cluster member 1*, Leukozytenrezeptorklaster Mitglied 1), TARS (*threonyl-tRNA synthetase*, Threonyl-tRNA-Synthetase), COX6B2 (*cytochrome c oxidase subunit 6B2*, Cytocrom c Oxidase Untereinheit 6B2), CLTB (*clathrin light chain B*, Clathrin leichte Kette B) und S100PBP (*S100P binding protein*, S100P Bindungsprotein) bestand. Ihr Metallkerndurchmesser sowie der hydrodynamische Durchmesser stiegen nur geringfügig. In serumfreiem Medium waren sie nicht stabil und fielen nach kurzer Zeit aus. Daher waren weitere analytische Untersuchungen mittels DLS und SAXS nicht möglich.

Zum Vergleich wurden in einigen Versuchen zusätzlich Silbernanopartikel verwendet, die mit Polyvinylpyrilidon (PVP), Tannin oder einem Peptid beschichtet waren sowie ein kommerziell erhältliches Nahrungsergänzungsmittel. Abbildung 5 zeigt TEM-Aufnahmen der 5 Partikel im Vergleich.

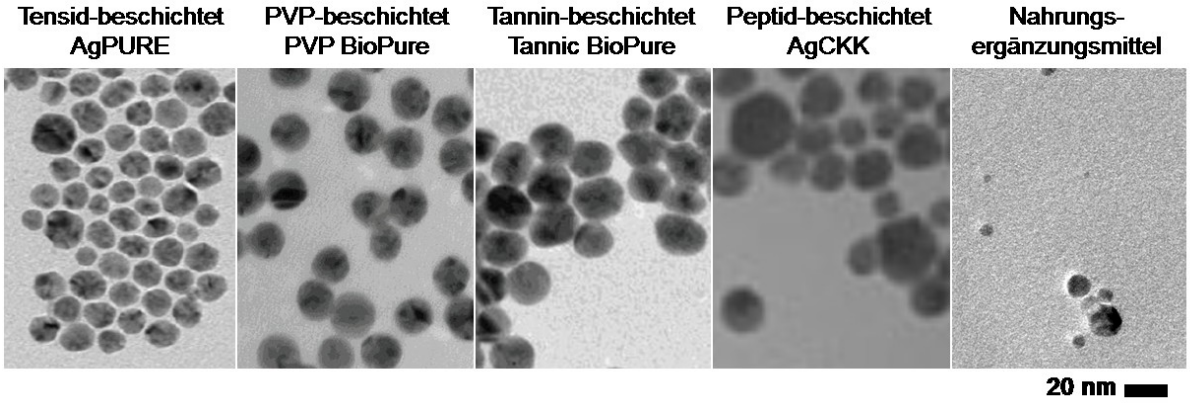

Abbildung 5: TEM-Aufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Silbernanopartikel [nanoComposix.com, 2013; Haase *et al.*, 2012a; Böhmert *et al.*, 2013].

Die **PVP-beschichteten Silbernanopartikel PVP BioPure™** und die **Tannin-beschichteten Partikel Tannic BioPure™** wurden kommerziell bei der Firma Nanocomposixs erworben. Beide waren sphärische Partikel mit einem Metallkerndurchmesser von 18,15 ± 0,04 nm bzw. 16,22 ± 0,6 nm (SAXS). Der Hersteller gab anhand von statistisch ausgewerteten TEM Aufnahmen eine Partikelgröße von 20,4 ± 1,8 nm bzw. 20,6 ± 1,7 nm an. Der hydrodynamische Durchmesser der PVP-beschichteten Partikel in der wässrigen Stammlösung betrug laut Hersteller 40,7 nm (DLS) und wurde an der BAM mit 32 ± 0,15 nm (DLS) gemessen. Der hydrodynamische Durchmesser der Tannin-beschichteten Silbernanopartikel betrug 21,42 ± 0,2 nm (DLS) in wässriger Lösung. Ihr Zetapotenzial lag bei -24,9 mV bzw. -42,6 mV [nanoComposix.com, 2013]. Die PVP-stabilisierten Silbernanopartikel waren stabil in serumhaltigem Zellkulturmedium. Sie bildeten eine Proteincorona, die unter anderem aus BSA (*bovine serum albumin*, Rinderserumalbumin), CCT8 (*t-complex protein 1 subunit theta*, T-Komplexprotein 1 Untereinheit θ), UTP14A (*U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A*, U3 kleines nukleolar RNA-assoziiertes Protein 14 Homolog A), ACTB (*actin beta*, Aktin β),

HARS (*histidine-tRNA ligase*, Histidin-tRNA Ligase) und SERPINB6 (*serpin B6*, Serpin B6) bestand. Dabei veränderte sich ihr Metallkernradius nicht, jedoch stieg ihr hydrodynamischer Radius auf 80 nm (DLS) an. Die Tannin-beschichteten Silbernanopartikel waren im Gegensatz dazu nicht stabil in serumhaltigem Medium. Sie neigten zu Dimerbildung. Die Partikel bildeten im Zellkulturmedium eine sehr breite Größenverteilung mit Partikeldurchmessern von ca. 40 bis fast 90 nm.

Zum Vergleich wurden in einigen Versuchen zusätzlich **Peptid-beschichtete Silbernanopartikel** einer vergleichbaren Größe verwendet. Diese waren mit einem Tripeptid aus Cystein, Lysin und Lysin (CKK) beschichtet. Die Silbernanopartikel wurden zeitweise von einem Kooperationspartner aus der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) zur Verfügung gestellt. Sie waren 18,8 ± 3,8 nm (SAXS) groß mit einem hydrodynamischen Durchmesser in wässriger Lösung von 27 ± 5 nm (DLS) und wurden als Pulver bei -80 °C gelagert [Graf *et al.*, 2009]. Sie wurden kurz vor der Verwendung frisch mit 0,001N HCl versetzt und mittels Ultraschall suspendiert.

Um einen Bezug zu derzeit verwendeten Produkten, die für die orale Aufnahme bestimmt sind, zu schaffen, wurde in einigen Versuchen zusätzlich ein kommerziell erhältliches **Nahrungsergänzungsmittel der Firma Fairvital** verwendet, das an der BAM im Rahmen der Diplomarbeit von Thomas Harwardt charakterisiert wurde. Das Produkt enthielt sphärische Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser in wässriger Lösung von 15 bis 25 nm (DLS) und einem Zetapotenzial von -25 mV. In serumhaltigem Zellkulturmedium stieg der hydrodynamische Durchmesser auf 25 nm (DLS) an, blieb aber über mindestens 48 h konstant.

Die Beschichtungen der verwendeten Partikel dienten vornehmlich zur Stabilisierung der Silbernanopartikelsuspension. Dabei sorgten die in dieser Arbeit verwendeten Beschichtungen vor allem für eine sterische Stabilisierung, obwohl sie aus sehr unterschiedlichen Stoffklassen stammten. Abbildung 6 zeigt die Beschichtungsmoleküle der in dieser Arbeit verwendeten Silbernanopartikel. Die zur Beschichtung verwendeten Verbindungen Tween 20 und Tagat TO sind grenzflächenaktive Moleküle. Tween 20 ist ein vor allem in pharmakologischen Erzeugnissen verwendetes nichtionisches Tensid. Es besteht aus der hydrophilen Kopfgruppe Sorbitan-polyoxyetylen, die durch eine Esterbindung an die hydrophobe Schwanzgruppe Laureat gebunden ist [Khossravi *et al.*, 2002]. Tagat TO ist ein Stoffgemisch, das nicht als einzelnes definiertes Molekül hergestellt werden kann, sondern immer in einer Mischung an mono-, di- und trisubstituierten Polyoxyethylentrioleatmolekülen mit Ölsäure sowie einer verschiedenen Längen an Polyoxyethyleneinheiten vorkommt. Der durchschnittliche Grad der Polymerisation beträgt 7 Einheiten. Der Stoff wird in der Kosmetikindustrie verwendet [Hensel *et al.*, 1997]. Tannine sind die am häufigsten vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Unterschieden werden zwei Klassen an Tanninen, die hydrolysierbaren und die kondensierten Tannine. Zu den

hydrolysierbaren Tanninen gehören die Galloylglucosen und Ellagitannine. Ihre Struktur besteht aus einem Polyol-Kern (meist Glucose), der über Esterbindungen Galloylgruppen trägt. Die Galloglucosen werden auch als Gallotannine bezeichnet, wenn ihr Molekulargewicht groß genug ist, um Proteinpräzipitationen *in vitro* zu verursachen. Erst bei einem hohen pH Wert oberhalb der pKa Werte von phenolischen Hydroxylgruppen (pH >9) liegen die meisten OH-Gruppen von Tanninen deprotoniert vor, während sie im nicht hydrolysierten Zustand über hydrophobe Wechselwirkungen mit Proteinen interagieren [Barbehenn und Constabel, 2011].

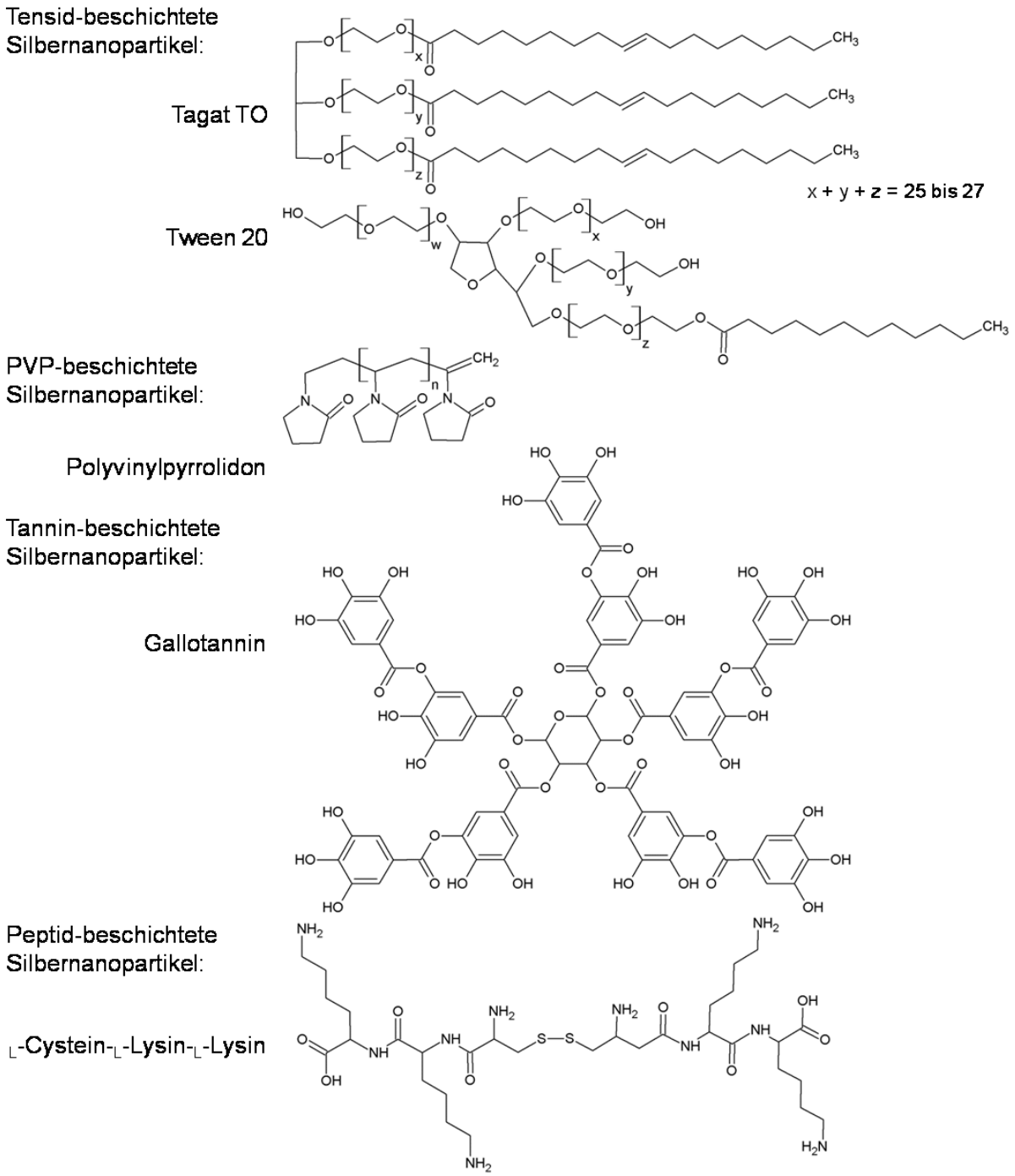

Abbildung 6: Chemische Strukturen der Moleküle, die zur Beschichtung der Silbernanopartikel verwendet wurden [sigmaaldrich.com, 2013; Hensel *et al.*, 1997; Khossravi *et al.*, 2002; Haase *et al.*, 2012a].

Tabelle 1: Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Silbernanopartikel.

Eigenschaft	Methode	AgPURE™	20nm PVP BioPure™	20nm Tannic BioPure™	Ag-CKK	Fairvital
Zustand		Suspension in Wasser	Suspension in Wasser	Suspension in Wasser	Pulver	Suspension in Wasser
Konzentration		10 % (w/v)	1 mg/mL[1]	1,08 mg/mL[1]	1 mg/mL in Stammlösung	500 ppm [3]
Partikelanzahl		---	$2{,}3 \cdot 10^{13}$ Partikel/mL[1]	$2{,}1 \cdot 10^{13}$ Partikel/mL[1]	---	---
Beschichtung		je 4 % (w/v) Tween 20 und Tagat TO	50-150 µg/mL 10 kDa PVP (CAS 9003-39-8)[1]	50-150 µg/mL Tannin (CAS 1401-55-4)[1]	Tripeptid: L-Cystein-L-Lysin-L-Lysin	keine
Form		sphärisch	sphärisch	sphärisch	annähernd sphärisch [2]	sphärisch
Größe (Durchmesser)	SAXS	13,84 ± 0,03 nm	18,15 ± 0,04 nm	16,22 ± 0,6 nm	18,8 ± 3,8 nm [2]	---
	DLS	29,4 ± 0,4 nm	40,7 nm [1] / 32 ± 0,15 nm	21,42 ± 0,2 nm	27 ± 5 nm [2]	15 bis 25 nm
	TEM	---	20,4 ± 1,8 nm [1]	20,6 ± 1,7 nm [1]	---	---
Polydispersität	SAXS	15 bis 17 %	—	12,3 %	18 % [2]	---
	DLS	26 %	11 %	17,1 %	---	---
	TEM	---	8,8 % [1]	8,1 % [1]	---	---
Zetapotenzial		- 30 mV (pH 6 bis 7)	-24,9 mV (pH 9,3) [1]	-42,6 mV (pH 5,5) [1]	---	-25 mV (pH 7,3)
in serumhaltigem Medium:						
Stabilität		stabil	stabil	nicht ganz stabil (Dimerbildung)	nicht stabil [2]	stabil
Größe (Durchmesser)	SAXS	13,86 ± 0,2 nm	18,15 ± 0,04 nm	16,22 ± 0,6 nm	---	---
	DLS	29,8 ± 0,31 nm	80 nm	siehe Abbildung 7	ca. 500 nm [2]	25 bis 35 nm
Polydispersität	SAXS	---	---	12,3 %	---	---
	DLS	21 %	16 %	---	---	---
in serumfreiem Medium:						
Stabilität		nicht stabil	---	---	---	---

[1] [nanoComposix.com, 2012]
[2] [Haase *et al.*, 2012 a; Haase *et al.*, 2012 b]
[3] [Fairvital.com, 2013]

4.2 Zellkultur

Als grundlegendes Modell zur Untersuchung der Toxizität sowie der intestinalen Aufnahme und zellulären Lokalisation von Silbernanopartikeln wurden Caco-2 Zellen verwendet. Zur Cokultivierung sowie zur vergleichenden Analyse der Zytotoxizität wurden zusätzlich die humane Hepatozytenzelllinie HepG2, die humane Lymphozytenzelllinie Raji und die humane Colonkarzinomzelllinie HT-29/B6 benutzt. Die Zelllinie Caco-2 Wildtyp wurde bei der Europäischen Zellkulturensammlung (*European Collection of Cell Cultures*) und HepG2 Wildtyp und Raji Wildtyp wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen erworben und die ersten beiden in den Passagen 20 bis 40 und 30 bis 40 verwendet. Die Zelllinie HT-29/B6 wurde in den Passagen 20 bis 35 verwendet. Sie wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke der Charité Berlin zur Verfügung gestellt, die den Klon aus dem HT-29 Wildtyp generiert haben [Kreusel *et al.*, 1991]. Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte in einem CO_2-Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und einem CO_2-Gehalt von 5 %. Sämtliche Arbeitsschritte, welche ein Öffnen von Medium- und Zellkulturgefäßen erforderten, wurden zur Vermeidung bakterieller und fungizider Kontaminationen unter einer Sterilwerkbank vorgenommen. Alle Flüssigkeiten, die mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden, wenn nicht anders erwähnt, zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die verschiedenen Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % (v/v) fötalen Kälberserum (FCS) und 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung kultiviert.

4.2.1 Passagieren der Zellen

Um die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase zu halten, mussten sie regelmäßig abgelöst und in geringerer Zellzahl neu ausgesät werden. Die adhärent wachsenden Zelllinien Caco-2, HepG2 und HT-29/B6 wurden 2 bis 3 mal/Woche bei einer Konfluenz von ca. 80 bis 90 % passagiert und in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen verdünnt. Dazu wurde das alte Medium in der Zellkulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit ca. 10 mL steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Nach Absaugen der Lösung wurde der Monolayer mit Trypsinlösung überschichtet (ca. 1 mL für 25 cm² Zellkulturflaschen und ca. 1,5 mL für 75 cm² Zellkulturflaschen) und für 3 bis 6 min für Caco-2 und HepG2 Zellen sowie ca. 15 bis 25 min für HT-29/B6 Zellen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen auf den Flaschenrand wurden die Zellen abgelöst, anschließend in serumhaltigem Medium aufgenommen und 3 min bei 150 ·g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem definierten Volumen Medium resuspendiert. Der benötigte Teil der Suspension wurde in neue Zellkulturflaschen überführt. Die Suspensionszelllinie Raji wurde direkt in ein Zentrifugenröhrchen überführt und

nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension in neuem Medium in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 auf frische Zellkulturflaschen verteilt. Einige Versuche fanden in serumfreiem Medium statt, das anstelle des fötalen Kälberserums 1 % Insulin / Transferin / Selen (ITS) enthielt.

Standard	/ Serumfreies	Zellkulturmedium:
DMEM (4,5 g Glucose, *L*-Glutamin, Na-Pyruvat)		
10 % (v/v)	---	hitzeinaktiviertes FCS
---	1 % (v/v)	Insulin / Transferin / Selen (ITS)
1 % (v/v)	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (100 µg/mL Endkonzentration)

phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):	
137 mM	Natriumchlorid (NaCl)
2,7 mM	Kaliumchlorid (KCl)
8 mM	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)
1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
pH	7,4

4.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung der Zellen wurden diese bei -80 °C eingefroren. Dafür wurden die trypsinierten und zentrifugierten Zellen in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einen vorgekühlten Einfrierkontainer (Mr. Frosty) gestellt, der im -80 °C kalten Tiefkühlschrank dafür sorgte, dass die Zellen langsam um 1 °C/min gekühlt wurden.

Um während des Auftauens die toxische Wirkung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO zu minimieren, wurden die Zellen schnell aufgetaut. Dies erfolgte durch Schwenken im Wasserbad und Aufnehmen in einem größeren Volumen Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen bei 150 ·g für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in neuem Medium resuspendiert und in eine kleine Kulturflasche (25 cm^2) überführt. Am darauf folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Einfriermedium:	
DMEM (4,5 g Glucose, L-Glutamin, Na-Pyruvat)	
20 % (v/v)	hitzeinaktiviertes FCS
10 % (v/v)	Dimethylsulfoxid (DMSO)

4.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der Neubauerkammer und Trypanblau Färbung. Dafür wurden 20 µL der betreffenden Zellsuspension mit 20 µL 0,4 %iger Typanblaulösung verdünnt und mindestens 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Färbung der toten

Zellen zu ermöglichen. Die anschließende Zählung musste innerhalb von 15 min erfolgen, da Trypanblau toxisch ist. Die gefärbte Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Einwegkammer gegeben und die lebenden, nicht blau gefärbten Zellen in den vier Großquadraten ausgezählt. Die Zellzahl/mL der Zellsuspension ergab sich aus dem Mittelwert der gezählten Quadrate multipliziert, aufgrund des Volumens eines Großquadrates von 0,1 µL mit 10^4 cm^3 und dem Verdünnungsfaktor der Trypanblau Färbung von 2.

4.2.4 Mycoplasmentest

Eine Kontamination mit Mycoplasmen kann, wie anderer Bakterien- oder Schimmelbefall, die Testergebnisse verfälschen, ist jedoch mikroskopisch schwer zu erkennen. Um eine mögliche Kontamination trotzdem festzustellen und ein weiteres Ausbreiten zu verhindern, wurden alle in Kultur befindlichen Zellen in regelmäßigen Abständen mittels MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit nach den Angaben des Herstellers am 96-*well* Plattenmessgerät Mithras LB940 auf einen Befall hin getestet und die betroffenen Kulturen entsorgt oder mit dem Kit BM Cyclin von Roche nach den Angaben des Herstellers behandelt.

4.2.5 Aussaat, Inkubation und Auswertung

Für die im Weiteren erläuterten Assays in 96-*well* Platten wurden die Zellen wie folgt ausgesät und inkubiert. Die adhärenten Zelllinien Caco-2, HT-29/B6 und HepG2 wurden zu je 10 000 Zellen/*well* ausgesät und 24 h kultiviert. Zur Untersuchung der differenzierten Caco-2 Zellen wurden diese zuvor ca. 21 Tage kultiviert, wobei alle 2 Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Die Suspensionszelllinie Raji wurde direkt vor der Inkubation zu je 10 000 Zellen/*well* ausgesät. Abweichend davon wurden in den E-Plate nur 6 125 Zellen/*well* (das entspricht 10 000 Zellen/*well* einer 96-*well* Platte) verwendet. Für Versuche im 12-*well* Format wurden 100 000Zellen/*well* ausgesät. Für die Inkubation wurde das Medium der adhärent wachsenden Zellen in allen Kavitäten der 96-*well* Platte abgesaugt und durch das halbe Inkubationsvolumen an Medium ersetzt. Anschließend wurde die andere Hälfte des Inkubationsvolumens einer doppelt konzentrierten Lösung hinzugegeben und für die jeweilige Inkubationszeit im Brutschrank kultiviert. Tabelle 2 zeigt die benutzten Inkubationsvolumina. Die verwendeten Konzentrationen an Nanopartikeln und Silberionen sind den Ergebnisdarstellungen zu entnehmen. Als Silberionenquelle wurde Silbernitrat verwendet und die Konzentration auf Silberionen bezogen angegeben. Die Auswertung der 96-*well* Versuche erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in Triplikaten je 96-*well* Platte und einer Reagenzienkontrolle ohne Zellen. Von den Messwerten wurden die Werte der entsprechenden Reagenzienkontrollen abgezogen und die Werte auf die

Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Jeder Versuch wurde in der Regel mindestens 3 mal wiederholt.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Inkubationsvolumina.

	proliferierende Caco-2	differenzierte Caco-2	HepG2	HT-29/B6	Raji
96-*well* Platten	100 µL	300 µL	100 µL	200 µL	100 µL
96-*well* Platten über Kopf	400 µL	---	---	---	---
E-Plate	100 µL	200 µL	---	---	---
12-*well* Platten	2 mL	2 mL	---	---	---

4.3 Aufnahme von Nanopartikeln

4.3.1 Kultivierung im Transwell®

Das Transwell®-System besteht aus einer 12-*well* Platte mit Einsätzen, die eine permeable Membran besitzen, auf denen die Zellen kultiviert werden können (siehe Abbildung 7). Die Kultivierung im Transwell®-System ermöglicht den Zugang zu beiden Seiten des Monolayers und damit die Untersuchung von Transportvorgängen. Durch die Fähigkeit der Caco-2 Zellen in einen polarisierten Zellrasen zu differenzieren, kann in diesem System ein apikaler und ein basolateraler Bereich unterschieden werden.

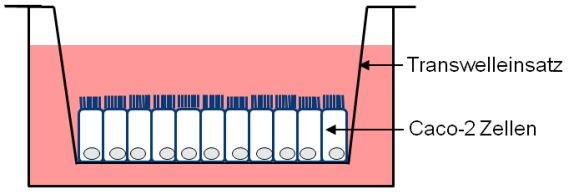

Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Transwells® [Hessel, 2010].

In dieser Arbeit wurden 12-*well* Transwell®-Platten mit Polykarbonatmembranen mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Porengröße von 3 µm verwendet. Die mediumbefüllten Transwells® wurden vor der Aussaat eine halbe Stunde im Zellkulturschrank equilibiert. Anschließend erfolgte die Aussaat der Caco-2 Zellen für die Monokultur und das M-Zell Modell oder der Caco-2 und HT-29/B6 Zellen (Verhältnis 80 : 20) für die Caco-2/HT-29/B6-Cokultur mit anschließender Differenzierungsphase von 21 Tagen. Es wurden je 50 000 Zellen/Transwell® in die oberen Kavitäten gesät. Für das M-Zell Modell wurde das Transwell® nach 5 Tagen invertiert, nach 16 Tagen wurden 50 000 Zellen/Transwell® Raji Lymphozyten zugegeben und einen Tag vor Inkubation wurde das Transwell® wieder in seine ursprüngliche Position gebracht. Die Cokultivierung fand in Anlehnung an das von Rieux *et al.* beschriebene invertierte Cokultur-Modell statt [Des Rieux *et al.*, 2007]. Die Etablierung des M-Zell Modells wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Gesine Herber durchgeführt. Dafür wurde die Einwanderung der Lymphozyten mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie verfolgt

und eine M-Zell-spezifische Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen. Die Etablierung der Caco-2/HT-29/B6-Cokultur wurde in Zusammenarbeit mit Dajana Lichtenstein durchgeführt. Dafür wurde eine Mucusfärbung mittels Alcian Blau und Periodic Acid-Schiff verwendet und der TEER sowie der FITC-Dextrandurchtritt gemessen. Der Mediumwechsel der Mono- und Caco-2/HT-29/B6-Kultur erfolgte alle 2 Tage. Zur Untersuchung der Silberverteilung in den drei Modellen wurden diese apikal mit Silbernanopartikeln und Silbernitrat in serumhaltigem und serumfreiem Medium inkubiert. Da nur ein intakter Zellmonolayer eine Untersuchung von gerichteten Transportvorgängen erlaubt, wurde die Integrität des Monolayers anhand des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) und des Fluorescein-Dextran-Durchtritts kontrolliert. Die Messung des TEER-Wertes erfolgte mithilfe eines Volt-Ohm-Meters mit Chopstick-Elektrode. Vor der Messung wurde die Elektrode nacheinander in 70 % Ethanol, PBS und Zellkulturmedium equilibiert. Zur Berechnung wurde der Leerwert eines unbewachsenen Transwell®-Einsatzes (ca. 100 Ω) abgezogen und die Messwerte mit der Membran-Fläche (1,12 cm^2) multipliziert, um den Widerstand in [Ω·cm^2] zu erhalten. Die TEER-Messung spiegelt vor allem den Widerstand der *Tight Junctions* wider und weniger die Integrität der Zellmembran [Konsoula und Barile, 2005; Mukherjee *et al.*, 2004], daher wurde diese durch vorangegangene Zytotoxizitätsuntersuchungen und die Messung ergänzt. Weiterhin wurde der Durchtritt von 10 kDa Fluorescein-markiertem Dextran (FITC-Dextran) gemessen. Für diesen Durchtritt konnte ein scheinbarer Permeabilitätskoeffizient P_{app} (*apparent permeability coefficient*) berechnet werden. Der P_{app} ist ein Parameter, der die Durchlässigkeit des Zellmonolayers für definierte Substanzen beschreibt. Er kann mit folgender Formel aus den Daten von Transportstudien bestimmt werden.

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{c_o} \qquad [\mathrm{cm/sec}]$$

Dabei entspricht dQ/dt dem Substanzfluss über den Monolayer in [µg/sec], A der Oberfläche des Monolayers in [cm^2] und c_0 der Ausgangskonzentration im Donorkompartiment in [µg/mL]. Voraussetzung ist ein Überschuss an Substanz im Donorkompartiment, sodass aus der Steigung der Regresssionsgeraden bei Auftragung der transportierten Stoffmenge über die Zeit der Substanzfluss über den Monolayer ermittelt werden kann. Fluorescein-Dextran wurde in einer Konzentration von 1 mg/mL bei der Inkubation von Transwells® dem apikalen Kompartiment zugesetzt. Nach der Inkubationszeit von 24 h wurden Proben aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und dessen Konzentration über die Fluoreszenz im Vergleich zu einer Kalibiergeraden am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940 bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm bestimmt. Nach 24 h in den Cokulturen und zusätzlich 4 h in der Monokultur wurde das Medium aus beiden Kompartimenten abgenommen, den Transwell®-Einsatz mit dem Monolayer zum Waschen in PBS geschwenkt und die Zellen samt

Membran sowie eine basolaterale Probe zur anschließenden Silberbestimmung in den Hochdruckmikrowellenaufschluss nach Absatz 4.5.1.1 Seite 36 gegeben.

4.3.2 TEM

Die Transmissionselektronenmikroskopie (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) ist ein bildgebendes Verfahren, das mit der unterschiedlichen Elektronendichte verschiedener Strukturen arbeitet, die in biologischen Proben mit Kontrastmitteln sichtbar gemacht werden.

Für die Untersuchung der Partikelaufnahme mittels TEM wurden Caco-2 Zellen im Transwell®, wie unter Absatz 4.3.1, Seite 32 beschrieben, kultiviert. Nach 21-tägiger Differenzierung wurden die Zellen 24 h apikal mit 5 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln in serumfreiem und serumhaltigem Medium inkubiert. Die Präparation der Proben fand an der Freien Universität Berlin statt. Dafür wurden die Zellen über Nacht mit Karnovsky-Lösung fixiert. Vor dem Einbetten wurden sie 30 min bei Raumtemperatur in Cacodylatpuffer gewaschen, 1 h in 2 % Osmiumtetroxid bei 4 °C vorkontrastiert und erneut mit Cacodylatpuffer gewaschen. Die Membran der Transwells® mit Monolayer wurde aus dem Transwell®-Einsatz geschnitten und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 40, 50, 70, 80, 90 und 2-mal mit 100 % Ethanol, je 10 min) dehydriert. Die Einbettung in eine Kunststoffmischung erfolgte bei 60 °C. Die Ultradünnschnitte wurden am Mikotom Reichert Ultracuts angefertigt und anschließend mit 2 % Blei- und Uranylacetat weiter kontrastiert. Die verringerte Kontrastierung bestand aus der Kontrastierung mit Osmiumtetroxid vor dem Einbetten. Die Betrachtung der Proben erfolgte in der FU Berlin am Zeiss 10 CR oder an der TU Berlin an einem FEI Tecnai G² 20 S-TWIN mit EDX-Analyse.

Karnovsky-Lösung:

PBS mit	
2 %	Formaldehyd
2,5 %	Glutaraldehyd

Cacodylatpuffer:

21,403 g	Cacodylsäure-Natriumsalz
auf 1000 mL	destilliertes Wasser
pH	7,4

Kunststoffmischung:

23,10 g	Glycidether 100
14,25 g	2-Dodecenylbernsteinsäureanhydrid
12,55 g	1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid
0,750 g	2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)-phenol

4.4 Zytotoxizitätsmessung

Zur Messung der Zytotoxizität wurden zwei Assays verwendet, um den Einfluss verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel den Eigenschaften der Nanopartikel oder des Testsystems, auf die Toxizität der Silbernanopartikel zu untersuchen.

4.4.1 CellTiter-Blue® - Cell Viability Assay

Das CellTiter-Blue® Reagenz (CTB) ist eine gepufferte Resazurin-Lösung, mit deren Hilfe die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt werden kann. Lebende Zellen reduzieren das dunkelblaue Resazurin zu rosafarbenem Resorofin, welches photometrisch detektiert werden kann. An der Reduktion sind diverse zytosolische und mitochondriale Reduktasen beteiligt. Tote Zellen verlieren schnell ihre metabolische Aktivität [Promega, 2009; Stoddart, 2011]. Dieser Assay kann daher als Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen verwendet werden, aus der auf die Viabilität und das Wachstum der Kultur geschlossen werden kann.

Für den Versuch wurden proliferierende oder differenzierte Caco-2, HT-29/B6, HepG2 und Raji Zellen im 96-*well* Platten verwendet und in serumhaltigen wie in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 4, 24 und 48 h wurden für den Viabilitätstest an proliferierenden Caco-2, HepG2 und HT-29/B6 Zellen 2 h vor dem jeweiligen Inkubationsende 20 µL/*well* CTB-Reagenz zugeben und für die verbleibende Zeit im Brutschrank inkubiert. Bei differenzierten Zellen erfolgte die Zugabe 30 min vor dem jeweiligen Inkubationsende mit 40 µL/*well* CTB-Reagenz. Die Messung des Fluoreszenzsignals des entstehenden Resorofins erfolgte am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940 bei einer Einstrahlungswellenlänge von 540 nm und einer Messwellenlänge von 590 nm. Zur Gewährleistung der Homogenität wurde jede Platte vor der Messung für 10 sec geschüttelt. Die Messungen der Tannin- und PVP-beschichteten Silbernanopartikel waren Teil der Diplomarbeit von Christin Langanke.

4.4.2 DAPI-Färbung

Da das CTB Reagenz für die Zellen nicht toxisch ist, kann das Wachstum der Zellen mit einer weiteren Methode parallel quantifiziert werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse der gemessenen Stoffwechselaktivität wurden die 96-*well* Platten anschließend für eine DNA-Färbung verwendet, die als Maß für die Zellzahl betrachtet werden kann. Der Kernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) interkaliert in die doppelsträngige DNA. Durch die Bildung eines DNA-DAPI-Komplexes wird die Eigenfluoreszenz des Farbstoffes erhöht, wobei die Fluoreszenzintensität zur Anzahl der Zellkerne proportional ist [Kapuscinski und Skoczylas, 1978]. Bei diesem einfachen Test ist zu berücksichtigen, dass apoptotische Zellen aufgrund der DNA-Kondensation das Signal verstärken und zu Fehlinterpretationen des Ergebnisses führen können [Ribble *et al.*, 2005].

Die im Anschluss jeder CTB Messung durchgeführte DAPI Färbung erfolgte mit einigen Modifikationen nach Klenow *et al.* [Klenow *et al.*, 2009]. Zunächst wurde die 96-*well* Platte 3 min bei 150 ·g zentrifugiert und der Überstand der Kavitäten verworfen. Durch Zugabe von 100 µL/*well* Methanol erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Nach erneuter

Zentrifugation und Entfernung des Methanols wurde die Platte für ca. 15 min getrocknet, bevor die Zellen mit 100 µL/*well* DAPI-Lösung (DAPI-Stammlösung: 3 mM DAPI im H_2O, dann 1:500 in PBS verdünnt) im Brutschrank für mindestens 30 min inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940 bei Wellenlängen von 380 nm Extinktion und 460 nm Emission. Die Messungen der Tannin- und PVP-beschichteten Silbernanopartikel waren Teil der Diplomarbeit von Christin Langanke.

4.5 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus

4.5.1 Einfluss der Ionenfreisetzung

Es steht immer noch zur Diskussion in wie weit die von den Silbernanopartikel freigesetzten Ionen ihre toxischen Wirkung bedingen. Um dies für die hier verwendeten Nanopartikel abschätzen zu können, wurde versucht, die in Zellkulturmedium freigesetzten Ionen zu bestimmen. Dies erfolgte zum einen durch Ultrazentrifugation der Suspension und zum anderen nach einer Gleichgewichtsdialyse. Die Ionenkonzentration im Medium wurde, wie im Abschnitt 4.5.1.1 Seite 36 beschrieben, analysiert.

Für den Ultrazentrifugationsansatz wurden mehrere Verdünnungen für 24 h im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 h bei ca. 98 000 ·g zentrifugiert und der Überstand für Zytotoxizitätsmessungen wie in Abschnitt 4.4.1, Seite 35 oder für die Silberanalytik verwendet. Für den Dialyseansatz wurde derselbe Versuchsaufbau wie in Abschnitt 4.5.1.2 Seite 37 nur ohne Zellen verwendet. Nach der Inkubation wurden Proben entnommen und der Silbergehalt, wie im Abschnitt 4.5.1.1 Seite 36 beschrieben, bestimmt.

4.5.1.1 Silberbestimmung

Vor der Elementanalyse mittels ICP-MS wurden alle Proben mit einem Hochdruckmikrowellenaufschluss behandelt, um störende komplexe organische Verbindungen zu beseitigen. Für den Aufschluss wurde das Hochdruckmikrowellensystem ETHOS verwendet. Die frischen oder bei -80 °C gelagerten Proben wurden in Quarzröhrchen überführt (Transwell®-Membran oder 0,5 mL Zellkulturmedium) und mit 2,5 mL konzentrierter Salpetersäure versetzt. Die Aufschlusskapseln wurden mit je 23 mL bidestilliertem Wasser und 2 mL Wasserstoffperoxid befüllt. Anschließend wurden je 3 Quarzröhrchen in die Aufschlusskapseln versenkt. Die Aufschlusskapseln wurden verschlossen, in die entsprechenden Halterungen gespannt und in den Rotor der Mikrowelle eingesetzt. Das unten aufgeführte Temperaturprogramm für den Säureaufschluss wurde mithilfe der von Dr. Stefan Weigel vom RIKILT-Institut der Niederlande zur Verfügung gestellten Informationen erarbeitet. Nach

Ablauf des Programms und dem Abkühlen der Proben wurden diese quantitativ in 10 mL PFA-Maßkolben überführt, mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, in 15 mL Reaktionsgefäße überführt und im Dunkeln gelagert. Alle Teile des Aufschlusses, die mit Proben in Kontakt gekommen waren, wurden im Säurewäscher gewaschen, anschließend in zwei Schritten mit destilliertem und bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet, bevor sie wiederverwendet wurden. Die ICP-MS-Messung der Proben erfolgte im Auftragslabor der Firma Eurofins. Die Bestimmungsgrenze des Auftragslabors lag bei 0,005 µg/mL Silber. Daraus ergab sich aufgrund der Verdünnung durch den Hochdruckmikrowellenaufschluss eine Bestimmungsgrenze für den Transwell®-Versuch von 0,05 µg/mL Silber in den Zellen mit Membran und 0,1 µg/mL Silber im Medium.

Temperaturprogramm Hochdruckmikrowellenaufschluss:

2 min	500 W	85 °C
3,5 min	700 W	140 °C
4,5 min	1000 W	180 °C
40 min	1000 W	190 °C
2 h		abkühlen

4.5.1.2 Quantitative *real time* RT- PCR

Ein weiterer Ansatz sollte zur Differenzierung zwischen der Wirkung der Silbernanopartikel und den von ihnen freigesetzten Ionen dienen. Dafür wurden die modifizierten Transwell®-Einsätze in 12-*well* Platten benutzt. Die Einsätze wurden von ihrer üblichen Membran befreit, in ihrer Länge leicht gekürzt, damit sie nicht die am Boden der 12-*well* Platten wachsenden Zellen berühren, und mit einer Dialysemembran bespannt. Durch die Inkubation der Nanopartikel im Inneren des Transwell®-Einsatzes konnten die Partikel keinen Kontakt zu den Zellen herstellen, jedoch die von ihnen freigesetzten Silberionen durch die Membran zu den Zellen gelangen. Abbildung 8 verdeutlicht den Versuchsaufbau und deren Umsetzung. Die Experimente wurden zum großen Teil während der Masterarbeit von Nina Hahne durchgeführt.

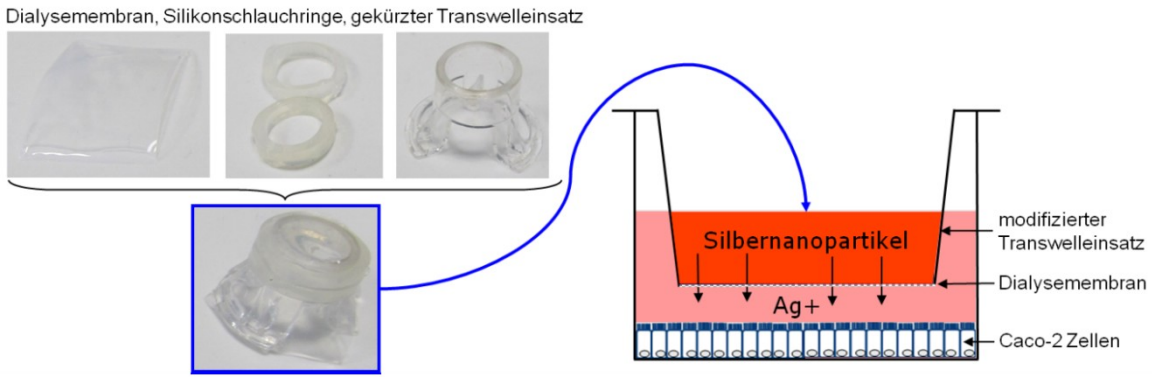

Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Inkubation von Caco-2 Zellen mit Silberionen, die von den Silbernanopartikeln freigesetzt werden, ohne einen Kontakt der Nanopartikel mit den Zellen zu ermöglichen.

Für den Versuch wurden 100 000 Caco-2 Zellen/*well* in 12-*well* Platten ausgesät, 21 Tage differenziert und anschließend mit und ohne entsprechenden Transwell®-Einsatz zur Trennung von Partikeln für 24 h im Zellkulturschrank inkubiert. Zusätzlich wurde auch ein Ansatz nur mit der Beschichtung als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet sowie die RNA isoliert und in cDNA, wie in Absatz 4.5.9.1 Seite 45 beschrieben, umgeschrieben. Aus der cDNA wurden mit spezifischen *Forward*- und *Reverse*-Primern 22 Gene (Tabelle 3) im Thermocycler MX3005™ QPCR mit dem SYBR Green System amplifiziert und über Fluoreszenzmessungen in Echtzeit quantifiziert. Die Primer wurden mit dem Programm Primer3 designt. Dabei wurden Fragmentgrößen von ca. 100 bp und Primerschmelztemperaturen von etwa 60 °C gewählt. Alle Primer wurden mittels Ensembl BlastN im Genom auf ihre Spezifität getestet und bei der Firma TIB MOLBIOL bestellt. Die Primerstocklösungen wurden mit Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Zur Verwendung wurden diese auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt. Um auszuschließen das Reste von genomischer DNA nach der RNA-Isolation zu Amplifikationsprodukten in der PCR führten und damit die Ergebnisse verfälschten, wurde ein Intron-überspannender Primer für das Gen SDHA eingesetzt. Als internes Referenzgen (*Housekeaping*-Gen) mit konstanter mRNA Expression wurde GAPDH verwendet. Für den PCR-Ansatz wurde 1 µl/*well* cDNA zu 9 µl PCR-Mastermix in eine optische 96-*well* Reaktionsplatte pipettiert. Die Expression wurde über die effizienzkorrigierte ΔΔCT-Methode quantifiziert. Nach Ablauf des letzten PCR-Zyklus (PCR-Bedingungen siehe Abschnitt 4.5.9.3 Seite 47) wurde eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen, anhand derer die Fragmentlängen der Amplifikate und dadurch die Spezifität der Primer sowie auf Verunreinigungen überprüft werden konnten. Ansätze ohne Templat dienten als Negativkontrollen.

Im Vorfeld der Expressionsanalysen wurde zunächst die Effizienz der Primer bestimmt, um eine Berechnung nach der effizienzkorrigierten ΔΔCT-Methode zu ermöglichen. Dazu wurde die PCR an mindestens 4 Verdünnungen einer cDNA aus unbehandelten Caco-2 Zellen durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die cDNA-Konzentrationen im späteren Arbeitsbereich der Analysen lagen. Aus den ermittelten Ct Werten wurde eine Standardkurve über die Templatekonzentration erstellt und der Korrelationskoeffizient, der über 0,9 liegen sollte, zwischen Template und Produkt berechnet. Die Effizienz (E) berechnet sie wie folgt:

$$Effizienz = 10^{\frac{-1}{m}}$$

mit m als Steigung der Geraden. Die Effizienz der Ziel- und Referenzprimer sollte sich nicht mehr als 0,2 voneinander unterscheiden. Die Berechnung der effizienzkorrigierten ΔΔCt Werte erfolgte nach Übertrag der Ct (Schwellenwert-Zyklus) Werte in Excel nach folgenden Formeln:

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta Ct Zielgen}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta Ct Referenzgen}} \qquad \text{mit} \qquad \Delta Ct = Ct_{Kontrolle} - Ct_{Behandlung}$$

Nach der Ermittlung der relativen Expression wurden die Ergebnisse der biologischen Replikate gemittelt und die Standardabweichung sowie ein signifikanter Unterschied der Behandlung zur Mediumkontrolle mittels *Student`s* t-Test berechnet.

PCR-Mastermix (9 µl):
5,0 µl SYBR Green Master Mix (2x)
0,6 µl Forward Primer (5 µM)
0,6 µl Reverse Primer (5 µM)
2,8 µl $H_2O_{(RNAse/DNAse\ frei)}$

Tabelle 3: Übersicht der Primer mit Sequenz, Fragmentgröße und Effizienz

Gen	Sequenz	Fragment-größe	Effizienz
ACTB	Forward: 5'- CGT CCA CCG CAA ATG CTT -3' Reverse: 5'- GTT TTC TGC GCA AGT TAG GTT TTG -3'	86 bp	2,186
ALB	Forward: 5'- TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA -3' Reverse: 5'- AAA GCA TGG TCG CCT GTT CA -3'	105 bp	2,279
ATP2C2	Forward: 5'- TTC TCG GTC TTG TGG GCA TC -3' Reverse: 5'- CAC AGA CAC ACC AGA CTC GG -3'	86 bp	2,204
CALM3	Forward: 5'- TGG GAA TGG CTA CAT CAG CG -3' Reverse: 5'- ATC CAC CTC CTC ATC GGT CA -3'	82 bp	2,234
CAMK2D	Forward: 5'- GGA GCA GCT GTG AAA TTG GC -3' Reverse: 5'- AGA TAT CCA GGT GTG CCA GC -3'	95 bp	2,316
CDH6	Forward: 5'- CAA GAG GCT GGA CAG GGA AG -3' Reverse: 5'- AAT TCA GAC TCG GGC TCC AC -3'	96 bp	2,386
CLDN3	Forward: 5'- GAA GAA GTA CAC GGC CAC CA -3' Reverse: 5'- CGT AGT CCTT GCG GTC GTA G -3'	95 bp	2,107
CXCR4	Forward: 5'- ATC AGT CTG GAC CGC TAC CT -3' Reverse: 5'- GGA ATA GTC AGC AGG AGG GC -3'	122 bp	2,134
FN1	Forward: 5'- CGA GCC CTG AGG ATG GAA TC -3' Reverse: 5'- ATC ATC GTG CAA GGC AAC CA -3'	125 bp	2,120
FOS	Forward: 5'- CTA CCA CTC ACC CGC AGA CT -3' Reverse: 5'- GTG ACC GTG GGA ATG AAG TT -3'	108 bp	2,107
GAPDH	Forward: 5'- ATT TGG CTA CAG CAA CAG GG -3' Reverse: 5'- CAA CTG TGA GGA GGG GAG A -3'	175 bp	2,021
HMOX1	Forward: 5'- GTG CCA CCA AGT TCA AGC AG -3' Reverse: 5'- TTG AGC AGG AAC GCA GTC TT -3'	109 bp	2,233
HSPA6	Forward: 5'- CAA GGC CCA GAT TCA TGA CG -3' Reverse: 5'- GCA GCA ACT TCT GCA CCT T -3'	71 bp	2,319
ITGA2	Forward: 5'- TGG GTC AGC ACC AAT TTC TT -3' Reverse: 5'- GCC ATC CAT GTT GAT GTC TG -3'	95 bp	2,272
ITPR2	Forward: 5'- CAT GCG TGT GTC CTT GGA TG -3' Reverse: 5'- GTC ACC CTC GCT TCT CAG TT -3'	85 bp	2,332
KEAP1	Forward: 5'- TCT TCA ACC TGT CCC ACT GC -3' Reverse: 5'- TTC GCA GTC GTA CTT GAC CC -3'	116 bp	2,263
NFE2L2	Forward: 5'- AGA GAC AGG TGA ATT TCT CCC A -3' Reverse: 5'- GGG AGT AGT TGG CAG ATC CA -3'	77 bp	2,294
OCLN	Forward: 5'- GTG AGT GCT ATC CTG GGC AT -3' Reverse: 5'- TGA GCA GTT GGG TTC ACT CC -3'	74 bp	2,203
PTK2	Forward: 5'- ACT GAT GCA TGG TGT GAA GC -3' Reverse: 5'- AAG GCT GTA GAG GGT AGG AGG -3'	118 bp	2,233
SDHA	Forward: 5'- TGG GAA AAT CAG CAA GCT CTA TG -3' Reverse: 5'- GGT CCG TGT TCC AGA CCA TT -3'	310 bp	
TJP3	Forward: 5'- GCC AGG ACT CGG ATG AAG AC -3' Reverse: 5'- GAT GAG TCG CCG TCA TAG CC -3'	79 bp	2,068
TUBB3	Forward: 5'- GCA AGG TGC GTG AGG AGT AT -3' Reverse: 5'- GTC TGA CAC CTT GGG TGA GG -3'	74 bp	2,293

4.5.2 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Morphologie der Zellen

Zur Untersuchung und Bewertung der morphologischen Veränderung der Zellen unter dem Einfluss der Nanopartikel wurden lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

4.5.3 Impedanzmessung – zeitlicher Verlauf der zellulären Reaktion

Die Impedanzmessung mittels xCELLigence System ist eine nicht invasive Messung des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) zellbedeckter Elektroden. Sie ermöglicht eine zeitaufgelöste Untersuchung adhärenter Zellen *in vitro*. Die Kultivierung erfolgt in speziellen 96-*well* Platten (*E-Plates*), die auf den Böden der Kavitäten Mikroelektroden aus Gold enthalten. Werden Zellen auf diesen Elektroden ausgesät, dann erhöht sich beim Anheften und Anwachsen der Zellen der Widerstand im Vergleich zur zellfreien Elektrode, da die Zellen als Isolator wirken. Der auftretende Stromfluss ist so gering, dass die Zellen nicht geschädigt werden. Wie in Abbildung 9 dargestellt, ändert sich der für den Stromfluss verfügbare Elektrolytzwischenraum zwischen den Zellen in Abhängigkeit von der Zellanzahl, der Stärke der Zellkontakte sowie der Morphologie der Zellen. Daher beeinflussen alle genannten Parameter die Impedanz [Stoddart, 2011; aceabio.com, 2013]. Die gemessenen Impedanzwerte werden in der Gerätesoftware in den *Cell Index* Wert konvertiert [Application Note, 2013].

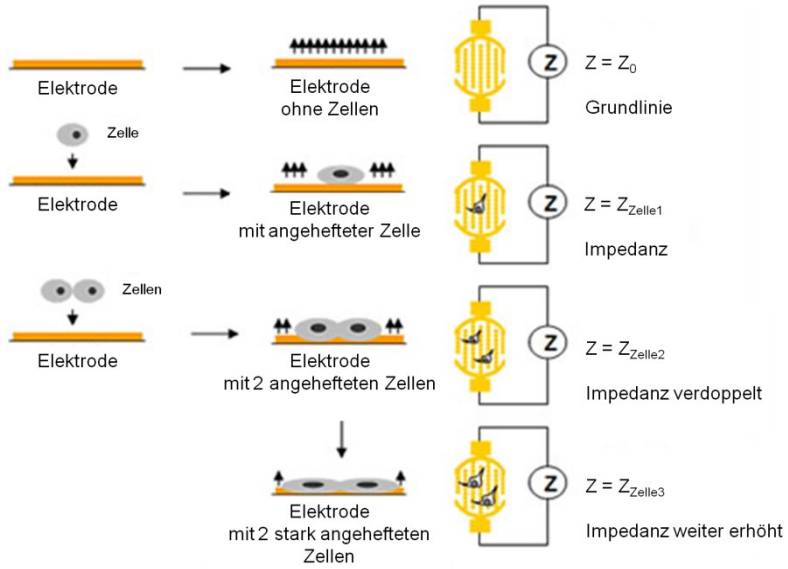

Abbildung 9: Funktionsweise des xCelligence-Systems der Firma Roche, in dem über Elektroden am Boden der 96-*well* Platte der Zellwiderstand in Abhängigkeit von Zellstärke, Zellbindung und Zellanzahl gemessen wird [aceabio.com, 2013].

Vor der Aussaat der Zellen wurden die Elektroden equilibiert. Dazu wurde eine *E-Platte* mit 100 µL/*well* Medium befüllt und für 30 min aufbewahrt. Anschließend wurde die Platte in die Messstation eingespannt, der Blindwert bestimmt und das Medium wieder abgesaugt. Nach der Aussaat wurden die Platten für 24 h oder 21 Tage zum Differenzieren in der Messstation (im

Brutschrank) belassen, um die Wachstumskurve aufzunehmen. Sie dienten der Kontrolle des Zellwachstums. Anschließend erfolgte die Inkubation. Die Messung wurde über 48 h durchgeführt, wobei die ersten 6 h alle 30 sec und die verbleibenden 42 h jede Minute gemessen wurde. Die zusätzlich mitgeführten *wells* ohne Zellen dienten der Kontrolle, ob die Inkubationslösungen einen Einfluss auf die Impedanz hatten. Die Messwerte der *wells* mit Zellen wurden auf die Mediumkontrolle bezogen und für den Zeitpunkt der Inkubation normiert. Der Versuch wurde mindestens 2-mal mit jeweils Triplikaten/Platte durchgeführt.

4.5.4 Messung der Apoptose

Als Apoptose werden Formen des Zelltodes zusammengefasst, die durch einen geordneten Ablauf innerhalb der Zelle gekennzeichnet sind, wobei es verschiedene Formen der Apoptose gibt [Galluzzi *et al.*, 2012]. Die Apoptose wird anhand von mehreren morphologischen und biochemischen Veränderungen definiert. Dazu gehören der Verlust der Zellmembranasymmetrie, die Aktivierung von Caspasen, der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials sowie morphologische Veränderungen [Tait, 2008; Stoddart, 2011]. Vereinfacht wird von der Apoptose (programmierter Zelltod) die Nekrose (zufälliger Zelltod) abgegrenzt.

4.5.4.1 Annexin V Färbung und FACS Messung

Lebende Zellen verfügen über eine asymmetrisch aufgebaute Zellmembran, in der sich das Phospholipid Phosphatidylserin ausschließlich an der Zellinnenseite der Membran befindet. Im Prozess der Apoptose kommt es unter anderem zum Verlust dieser Asymmetrie und zur Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellen. *In vivo* können sterbende Zellen dadurch von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden. *In vitro* wird diese Eigenschaft genutzt, um das Phosphatidylserin durch fluoreszenzmarkiertes Annexin V, das intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann, zu markieren und somit die apoptotischen Zellen nachzuweisen. Zur Unterscheidung der apoptotischen von nekrotischen Zellen, deren Membranen üblicherweise durchlässig sind, wird zusätzlich ein ebenfalls nicht membrangängiger Kernfarbstoff verwendet. Lebendige Zellen bleiben daher ungefärbt, Annexin V-positive Zellen ohne Kernfärbung werden als apoptotisch eingestuft und doppelt gefärbte Zellen sind nekrotisch oder befinden sich in einer späten Phase der Apoptose [Tait, 2008; Stoddart, 2011].

Der Versuch erfolgte an proliferierenden Caco-2 Zellen. Zur Inkubation wurde serumfreies Medium verwendet. Als Positivkontrolle diente 10 µM Staurosporin. Nach Ende der der Inkubationszeit von 2, 4, 6, 8, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 42, 44, 46 und 48 h wurden die Zellen mittels Trypsinierung geerntet und vereinzelt, in PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach dem Waschen mit 2 mL Annexin V-Puffer wurden sie in 50 µL

Annexin V-Puffer mit je 2,5 µL Annexin V und 7-AAD für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt. Nach Zugabe von 200 µL Annexin V-Puffer erfolgte die Messung am Durchflusszytometer Canto II. Die Auswahl des *Gates* und der Quadranten zur Unterscheidung der Zellen nach lebend, apoptotisch und tot erfolgt innerhalb jedes Versuches für alle Proben einheitlich. Die Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und mindestens 2-mal wiederholt.

Annexin V-Puffer:

10 mM	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
140 mM	Natriumchlorid (NaCl)
5 mM	Calciumchlorid ($CaCl_2$)

4.5.4.2 Caspase Messung

Caspasen sind Cystein-Asparaginsäure-spezifische Proteasen, die durch die Spaltung einer Reihe von Proteinen die Apoptose realisieren. Caspasen werden als inaktive Vorstufen exprimiert und im Verlauf der Apoptose kaskadenartig aktiviert [Tait, 2008; Stoddart, 2011]. Die Caspaseaktivität kann unter anderem mittels Luciferaseassay detektiert werden. Ein solcher Assay enthält das Substrat Aminoluciferin und eine Luciferase, sodass aktivierte Caspasen im Zelllysat durch Abspaltung einer Peptidsequenz das Luciferin freisetzen, welches durch die Luciferase oxidiert werden kann. Die dabei entstehende Lumineszenz wird gemessen [Promega, 2012].

In 96-*well* Platten differenzierte Caco-2 Zellen wurden in serumfreiem Medium inkubiert. Als Positivkontrolle diente 2,5 µM Staurosporin. Nach Ende der Inkubationszeit von 24 und 48 h wurde die Caspaseaktivität der Caspasen 3 und 7 mithilfe des Caspase-Glo® 3/7 Assays von Promega bestimmt. Dafür wurde die Platte zentrifugiert, das Medium verworfen und mit 200 µL/*well* PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Anwendung nach den Angaben des Herstellers. 100 µL des Reagenzgemisches wurden zu den Zellen gegeben, die Platte geschüttelt, für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Lumineszenz am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940 gemessen. Der Versuch wurde mindestens 2-mal wiederholt.

Auf Deckgläschen in 12-*well* Platten differenzierte Caco-2 Zellen wurden mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln sowie 2,5 µM Staurosporin als Positivkontrolle in serumfreiem Medium inkubiert. Die Färbung erfolgte nach 8, 24, 30 und 48 h mithilfe des Image iT Kits nach den Angaben des Herstellers. Nach dem Färben wurden die Zellen umgehend mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axio Observer dokumentiert. Dabei wurden mit identischen Geräteeinstellungen für alle Behandlungen je Präparat ca. 20 Fotos aufgenommen und die Fluoreszenzintensität mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms Gimp ausgewertet. Die gesammelten Werte wurden mit Hilfe von Excel in Form von Mittelwert und Standardabweichung ausgewertet. Jeder Versuch wurde mindestens 3-mal wiederholt.

4.5.5 Messung des oxidativen Stresses

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen unter anderem als Nebenprodukt des oxidativen Stoffwechsels, der Atmungskette. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören Superoxidanionen, Hydrogenperoxide und Hydroxylradikale. Eine verstärkte Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies wird als oxidativer Stress bezeichnet und kann zu schweren zellulären Schäden führen. Exogene Stoffe können direkt oxidativen Stress oder indirekt über die Störung des zellulären Redoxgleichgewichts verursachen [Alfadda und Sallam, 2012]. Diese Störungen können verschiedene Stoffwechselwege an- und ausschalten [Chiarugi und Giannoni, 2008].

4.5.5.1 Dichlorofluoreszein (DCF) Assay

Für die Bestimmung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde 2`,7`-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA) eingesetzt. Das DCFH-DA wird in der Zelle enzymatisch zu 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) hydrolysiert. Anschließend oxidieren reaktive Sauerstoffspezies das DCFH zum fluoreszierenden 2`,7`-Dichlorofluorescein (DCF). Die Umwandlung kann am Fluoreszenzspektrometer verfolgt werden. Aufgrund einer möglichen Autooxidation musste lichtarm gearbeitet werden [Gomes *et al.*, 2005].

Die Versuche wurden an differenzierten Caco-2 Zellen im 96-*well* Format durchgeführt. Am Versuchstag wurde das Medium entfernt und die Zellen für 60 min mit je 100 µL/*well* einer 0,2 mM DCF-Lösung in serumfreiem Zellkulturmedium im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit je 200 µL/*well* PBS gewaschen und anschließend inkubiert. Als Positivkontrolle wurde eine Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat Lösung (100 µg/mL Fe^{2+}) gewählt. Die Messung erfolgte nach 24 h am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940 bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 520 nm.

4.5.5.2 Zytotoxizität nach Vorinkubation mit Antioxidantien

Die Vorinkubation der Zellen mit antioxidativ wirksamen Stoffen sollte die Wirkung von Substanzen reduzieren, die einen Einfluss auf das Redoxgleichgewicht der Zellen haben und somit vor oxidativem Stress schützen. Für diesen Versuch wurden proliferierende Caco-2 Zellen im 96-*well* Format verwendet. Vor der 24 h Inkubation erfolgte eine Vorinkubation für 1 h mit 10 mM *N*-Acetylcystein (NAC) oder 100 µM Vitamin C. Anschließend wurde mit 100 µL/*well* PBS gewaschen. Die Messung erfolgte wie in den Abschnitten 4.4.1, Seite 35 und 4.4.2, Seite 35.

4.5.5.3 Glutathion Assay

Glutathion ist das Tripetid γ-Glutaminyl-Cysteinyl-Glycin (GSH), das in eukaryotischen Zellen in großer Menge vorhanden ist. Es liegt zum überwiegenden Teil in reduzierter Form vor, nur ein geringer Anteil ist als Dimer über eine Disulfidbrücke in reduzierter Form (GSSG) zu finden. Glutathion fungiert unter anderem als Puffer für oxidativen Stress. Daher kann der Gehalt als Indikator für zellulären Stress durch reaktive Sauerstoffspezies verwendet werden [Promega, 2011].

Für den Versuch wurden differenzierte Caco-2 Zellen im 96-*well* Platten verwendet. Nach der Inkubation für 24 h wurde der Glutathionstatus mithilfe des GSH/GSSG-Glo™ Assays nach den Angaben des Herstellers gemessen. Als Positivkontrolle diente 100 µM Buthioninsulfoximin. Zur Messung wurde die Platte zuvor 3 min bei 150 ·g zentrifugiert und das Medium verworfen. Die Lumineszenzmessung erfolgte am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940.

4.5.6 Messung des Calciumeinstroms

Calciumionen (Ca^{2+}) dienen in der Zelle unter anderem als Botenstoffe der Signalweiterleitung diverser intrazellulärer Signalwege. Dafür steigt die geringe Ca^{2+}-Konzentration im Zytoplasma kurzfristig und lokal begrenzt an, indem sich Ca^{2+}-Kanäle in Membranen öffnen. Die erhöhte Ca^{2+}-Konzentration im Zytoplasma wird sofort durch Ca^{2+}-bindende Proteine abgepuffert, um eine zytotoxische Wirkung zu vermeiden [Berridge *et al.*, 2003]. Die Ausschüttung von Ca^{2+} als *second messenger* in das Zytoplasma wird über einen zuvor in die Zelle eingebrachten Fluoreszenzfarbstoff, der über zelluläre Esterasen durch die Abspaltung einer lipophilen Schutzgruppe aktiviert wird, bestimmt. Der nun negativ geladene Farbstoff kann bei einer erhöhten Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem extrazellulären Raum, das positiv geladene Ca^{2+} bindet und erhöht damit seine Fluoreszenz [AAT Bioquest, 2010].

Für die Messung des Calium-Fluxes wurde der Screen Quest™ Fluo-8 Medium Removal Calcium Assay verwendet. Proliferierende und differenzierte Caco-2 Zellen wurden in 96-*well* Platten inkubiert. Vor der Inkubation wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit jeweils 200 mL/*well* PBS gewaschen und der Puffer mit Fluoreszenzfarbstoff unter Lichtausschluss zu 100 µL/*well* in die Platte gegeben. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank und 30 min Aufbewahrung bei Raumtemperatur wurden 50 µL/*well* entnommen und jeweils 50 µL/*well* der Verdünnungsreihe hinzugegeben. Als Positivkontrolle diente 50 %iges Ethanol [Kokoska *et al.*, 1998]. Die Messung am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940 bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm begann unmittelbar nach beendeter Zugabe der Verdünnungsreihe und wurde über 60 min alle 35 sec fortgeführt.

4.5.7 Messung des mechanischen Stresses

Da im Laufe der Inkubation der Zellen mit Silbernanopartikelsuspensionen sich eine makroskopisch erkennbare Schicht auf den Zellen absetzte, sollte in einem einfachen Versuchsansatz abgeschätzt werden, inwieweit die Nanopartikel den Zellen rein mechanisch schaden.

Dafür wurde wie in Abschnitt 4.4.1, Seite 35 die Zytotoxizität auf proliferierenden Caco-2 Zellen analysiert. Davon abweichend wurden 400 µL/*well* verwendet. Es wurden zwei Platten gleich behandelt und mit Parafilm unter dem Plattendeckel bedeckt. Eine 96-*well* Platte wurde aufrecht und die andere über Kopf gelagert.

4.5.8 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

Die Depolarisation von Mitochondrien kann ein ausschlaggebender Schritt bei der Induktion von Apoptose sowie Nekrose sein [Kinnally *et al.*, 2011]. Sie kann mit Hilfe von speziellen Fluoreszenzsonden gemessen werden. Dies sind Farbstoffe, die selektiv in Mitochondrien eindringen und pH-abhängig ihre Farbe zwischen Grün und Orange ändern können. Der hier verwendete kationische rote Farbstoff formt in normalen Zellen Aggregate in der mitochondrialen Matrix. Werden in apoptotischen oder nekrotischen Zellen die Zellmembranen der Mitochondrien durchlässig, diffundiert der Farbstoff in das Zytosol und zerfällt in seine monomere grüne Form [AAT Bioquest, 2012].

Differenzierte Caco-2 Zellen wurden in 96-*well* Platten für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle diente 2,5 µM Staurosporine. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Depolarisation der Mitochondrien mithilfe des Cell Meter™ JC-10 Mitochondria Membrane Potential Assay nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zuvor wurde die Platte bei 150 ·g zentrifugiert, das Medium verworfen und mit 200 µL/*well* PBS gewaschen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am 96-*well*-Plattenmessgerät Mithras LB940 bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm.

4.5.9 Transkriptomanalysen

4.5.9.1 Zellernte, RNA-Isolierung, -Qualitätskontrolle und cDNA Synthese

Zur Ernte der Zellen wurde das Medium entfernt und der Zellrasen 2 mal mit PBS gewaschen. Nach vorsichtigem Ablösen der Zellen mittels Zellschaber, wurden diese in PBS in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 300 ·g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Lagerung bei -80 °C eingefroren. Die anschließende RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kit mit integriertem DNase-Verdau nach dem Protokoll des Herstellers. Die

Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop™ 1000 bestimmt. RNA ist aufgrund seiner einsträngigen Struktur sehr empfindlich gegenüber mikrobieller und thermischer Degradation. Eine intakte RNA ist jedoch entscheidend für aussagekräftige Transkriptomanalysen. Daher wurde die Qualität der isolierten RNA mittels Mikrogelelektrophorese im Bioanalyzer nach den Angaben des Herstellers kontrolliert. Die Qualität wurde von der *Software* als Wert auf einer RIN-Skala (*RNA integrity number*) zwischen 1 und 10 nach einem Algorithmus von Schroeder *et al.* berechnet und ausgegeben [Schroeder *et al.*, 2006]. Der erhaltene RIN-Wert sollte idealer Weise bei 10 liegen, aber auch Werte bis 7 werden noch als akzeptabel angesehen. Für die Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird doppelsträngige DNA benötigt. Daher wurde die isolierte RNA mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte für den PCR-Array mit dem RT² First Strand Kit nach den Angaben des Herstellers oder mit Hilfe von Einzelkomponenten. Zu 30,75 µL cDNA-Mastermix wurde RNA in einer Endkonzentration von 20 ng/µL dazugegeben und mit RNAse-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt. Das Umschreiben erfolgte nach dem unten aufgeführten Temperaturprogramm im PCR Thermocycler GeneAmp 9700. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

cDNA-Mastermix (37,5 µL):

5 µL	10x TaqMan RT Puffer
11 µL	$MgCl_2$ (25 mM)
10 µL	dNTP Mix (2,5 mM)
2,5 µL	Random Hexamer (50 µM)
1 µL	RNAse Inhibitor (20 U/L)
1,25 µL	Multiscribe™ Reverse Transkriptase (50 U/L)

cDNA-Synthesebedingungen:

Random Hexamer Annealing	10 min	25 °C
Reverse Transkription	30 min	48 °C
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	5 min	95 °C
Kühlung	∞	4 °C

4.5.9.2 Micro-Array

Die DNA-Chiptechnologie ermöglicht die Analyse komplexer biologischer Proben mit Hilfe von mikroskopischen Arrays (Micro-Arrays) auf denen einzelsträngige genspezifische und zur mRNA komplementäre Oligonucleotide an eine feste Oberfläche gebunden sind, die mit markierten mRNA-Proben hybridisiert werden. Die an den Oligonukleotiden gebundene mRNA kann über die Fluoreszenzdetektion quantifiziert und vergleichend analysiert werden [Lemieux *et al.*, 1998].

Zur Untersuchung des Einflusses von Silbernanopartikeln auf die mRNA-Expression differenzierter Caco-2 Zellen wurden die Zellen in 75 cm^2 Flaschen 21 Tage differenziert. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert. Die Inkubation erfolgte in 20 mL serumfreiem

Zellkulturmedium für 24 h. Es wurden jeweils Triplikate angefertigt. Die Schritte von Zellernte bis cDNA-Synthese sind im Abschnitt 4.5.9.1 Seite 45 beschrieben. Die RNA Proben wurden an der Charité Berlin im Fachbereich von Herrn Prof. Dr. Hummel mittels Micro-Array GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 analysiert. Die dabei erstellten differenziellen Genexpressionslisten dienten als Grundlage für eine Stoffwechselweganalyse mit der *Ingenuity Pathway Analyse* (IPA) *Software*. In die Analyse wurden alle Gene einbezogen, deren mRNA-Expression durch die jeweilige Behandlung der Zellen im Vergleich zu denen unbehandelter Zellen signifikant um das 1,4 fache verändert war ($p < 0,05$ und *Fold Change* von $-1,4 \geq fc \geq 1,4$). Zusätzlich wurden in der IPA *Software* für die Analyse folgende Einstellungen gewählt: Es wurden direkte und indirekte Beziehungen berücksichtigt, 140 Moleküle pro Netzwerk dargestellt, nur Beziehungen in Betracht gezogen, die experimentell beobachtet wurden und nicht auf spezifische Spezies, Gewebe oder Zelllinien eingeschränkt.

4.5.9.3 PCR-Array

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Micro-Array Analyse wurde die differentielle Expression ausgewählter Gene mittels quantitiativer real-time RT-PCR überprüft. Bei der PCR wird die Fluoreszenz eines DNA-Farbstoffes während der Temperaturzyklen der Amplifikation eines DNA-Abschnittes in einer Polymerase Kettenreaktion aufgezeichnet [Dorak, 2007].

Für 89 Gene, die aus den Daten der Micro-Array Analyse ausgewählt wurden, wurde bei der Firma SABiosciences ein *customized* PCR-Arrays erstellt. Der PCR-Array wurde zum einen mit denselben mRNA-Proben durchgeführt, die auch mittels Micro-Array analysiert wurden, und zum anderen mit einem biologischen Replikat in Form eines weiteren Ansatzes, der analog zu Abschnitt 4.5.9.2 Seite 46 kultiviert und inkubiert wurde. Für die Herstellung des Replikats wurden noch zwei zusätzliche Nanopartikelkonzentrationen verwendet. Die Kulturen des biologischen Replikats wurden als Duplikate angefertigt. Nach der RNA Isolation, Qualitätskontrolle und cDNA Synthese (siehe Abschnitt 4.5.9.1 Seite 45) wurden alle Proben mittels PCR-Array von SABicosciences RT^2 Profiler™ PCR-Array: CAPH10676 Custom Array am PCR-Thermocycler 7900HT Fast Real-time PCR-System mit dem unten genannten Temperaturprogramm analysiert und die Daten mittels ΔΔCt Methode ausgewertet. Die Berechnung der ΔΔCt Werte erfolgte nach Übertrag der Ct (Schwellenwert-Zyklus) Werte in Excel nach folgenden Formeln:

$$Ct_{(Zielgen)} - Ct_{(Referenzgen)} = \Delta Ct$$

$$\Delta Ct_{(behandelt)} - \Delta Ct_{(unbehandelt)} = \Delta\Delta Ct$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = Ratio$$

Nach Ablauf des letzten PCR-Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte Informationen über die Fragmentlängen der Amplifikate, die

Spezifität der *Primer* sowie über Verunreinigungen in der Probe. Die PCR-Ergebnisse wurden mittels *Student`s* t-Test auf ihre Abweichung im Vergleich zur Mediumkontrolle getestet. Dabei wurden alle Gene als reguliert betrachtet, deren Expression mindestens um das 1,5 fache signifikant verändert war (*Fold Change* von $-1{,}5 > x > 1{,}5$ und $p < 0{,}05$).

PCR-Bedingungen:

Aktivierung der Polymerase	15 min	95 °C	
Denaturierung	15 sek	95 °C	40 Zyklen
Primer Annealing und Extension	1 min	60 °C	
Finale Extension	15 min	60 °C	
Schmelzkurvenanalyse	15 sec	95 °C	
	20 sec	60 °C	
	15 sec	95 °C	

5 Ergebnisse

5.1 Silbernanopartikelaufnahme im Intestinalmodell

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Aufnahme von Silbernanopartikeln über das intestinale Epithel näher betrachtet. Zu diesem Zweck wurden Transwell®-Versuche durchgeführt. Dabei wurden Caco-2 Zellen als Modell für die absorptiven Enterozyten verwendet. Da die Enterozyten im Dünndarm nicht in Monokultur vorkommen, wurden zusätzlich zwei Cokulturen verwendet: einerseits mit Raji B-Lymphozyten, die die auf Partikelaufnahme spezialisierten M-Zellen widerspiegeln und andererseits mit HT-29/B6-Zellen, die eine Mucusschicht bilden. Zusätzlich wurde die zelluläre Aufnahme und Verteilung der Partikel in den Intestinalzellen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie im Caco-2 Modell untersucht.

5.1.1 Silbertransport im Transwell®

Durch die Kultivierung von Zellen im Transwell®-System wird der Zugang zu beiden Seiten des Monolayers und dadurch eine Untersuchung von Transportvorgängen ermöglicht.

Sowohl die Caco-2 Monokultur als auch die beiden Cokulturen zeigten nach Inkubation mit 1 µg/mL Silbernitrat sowie 5 und 10 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln über 24 h einen konstanten transepithelialen elektrischen Widerstand (*trans-epithelial electrical resistance*, TEER) und keine Veränderung des FITC-Dextran Durchtritts im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dies zeigte, dass die gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Integrität des Monolayers der Mono- und Cokulturen hatten (Abbildung A1 in Anhang). Es konnte basolateral kein Silber nach apikaler Inkubation detektiert werden. Dies galt ebenfalls für die Cokulturen, obwohl deren TEER-Werte insgesamt etwas niedriger lagen, als bei der Monokultur. Das bedeutete, dass in Bezug auf die Bestimmungsgrenze weniger als 10 % des Silbers aus Silbernitrat und weniger als 1 bzw. 2 % des Silbers aus den Nanopartikeln die basolaterale Seite erreichten. Im Rahmen des Versuches wurde auch der Monolayer samt Transwell®-Membran auf ihren Silbergehalt analysiert (Abbildung 10). Dabei fand sich ein steigender Silbergehalt in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration der Nanopartikel. Weiterhin war sowohl im M-Zell Modell sowie in der Cokultur mit HT-29/B6 ein deutlich höherer Silbergehalt als in der Caco-2 Monokultur zu finden. Bei diesen Messungen ließ sich jedoch nicht unterscheiden, ob es sich bei der aufgenommenen Silberspezies um Nanopartikel oder Silberionen handelte. Auch war unklar, ob das Silber sich in den Zellen befand oder so fest an der Oberfläche der Zellen haftete, dass es sich beim Waschen (Schwenken des gesamten Transwell®-Einsatzes in PBS) nicht ablöste.

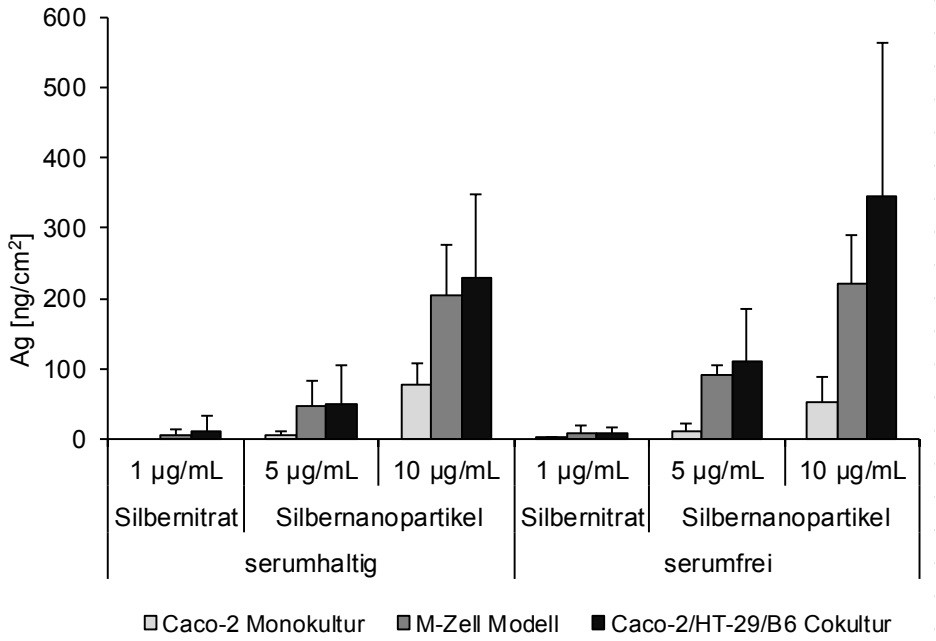

Abbildung 10: Silbergehalte des Zellmonolayers im Transwell® nach 24 h Inkubation mit Silbernitrat oder Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln. Transwells® mit der Caco-2 Monokultur oder den Cokulturen M-Zell Modell und Caco-2/HT-29/B6-Cokultur wurden apikal für 24 h mit nicht zytotoxischen Konzentrationen an Silbernitrat oder Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert und der Silbergehalt des Zellmonolayers einschließlich Transwell®-Membran wurde nach Waschen in PBS und Hochdruckmikrowellenaufschluss mittels ICP-MS bestimmt.

5.1.2 TEM-Bilder der Nanopartikelaufnahme

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde geklärt, ob es sich bei dem im Transwell®-Versuch in den Zellen gefundenen Anteil an Silber um Nanopartikel handelte. Weiterführend wurde dann der genaue Verbleib der Partikeln in den Zellen festgestellt.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von differenzierten Caco-2 Zellen, die mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln für 24 h in serumfreiem und serumhaltigem Medium inkubiert wurden, sind in Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellt. Bei voller Kontrastierung ließen sich unter anderem in der Mediumkontrolle sehr gut einzelne zelluläre Strukturen, wie Mikrovilli, *Tight Junctions*, Zellkerne sowie Ribosomen und diverse membranumschlossene Kompartimente erkennen. Nanopartikelbehandelte Proben zeigten vor allem in serumfreiem Medium sowie in serumhaltigem Medium, Nanopartikel und deren Aggregate außerhalb der Zelle, teilweise in Kontakt mit dem Mikrovillisaum der Zellen. In den voll kontrastierten Aufnahmen waren vereinzelt auch schwarze Punkte, die auf Nanopartikel hindeuten, innerhalb der Zellen zu finden. Es zeigte sich jedoch keine Assoziation mit zellulären Strukturen und die Lage der vermeintlichen Nanopartikel war sehr zufällig. Eine nachfolgende Elementanalyse mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) zeigte, dass diese Strukturen unter anderem aus den für die Kontrastierung verwendeten Elementen Blei und Uran

bestanden. Nach reduzierter Kontrastierung und Elementanalyse, wodurch die Missinterpretation von Artefakten vermieden wurde, konnten innerhalb der Zellen keine Nanopartikel gefunden werden.

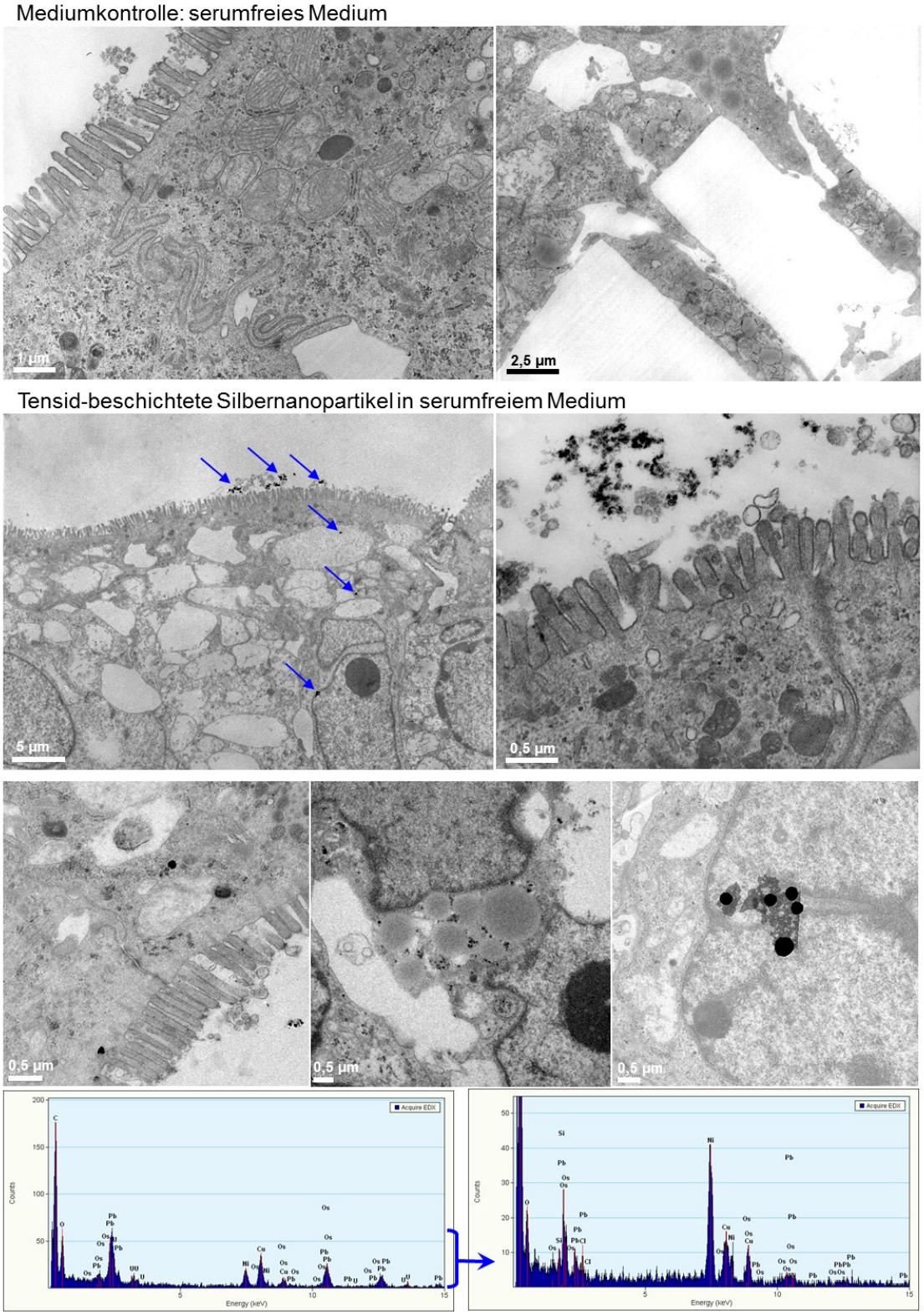

Abbildung 11: TEM Aufnahmen von differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln in serumfreiem Medium. Die Präparate wurden voll kontrastiert. Die blauen Pfeile kennzeichnen als Nanopartikel interpretierbare Strukturen. Die dargestellte Elementanalyse zeigt ein Spektrum der Artefakte.

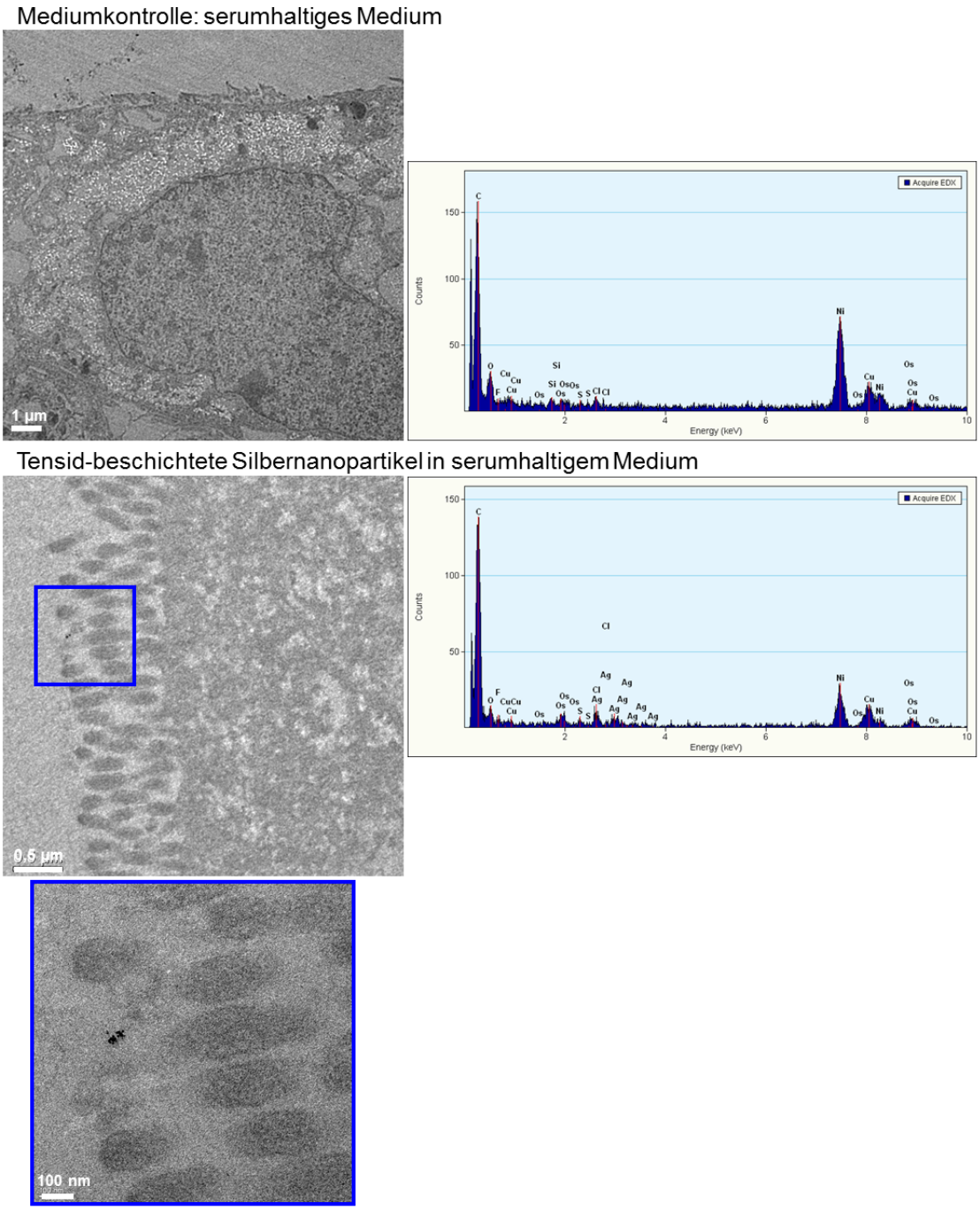

Abbildung 12: TEM Aufnahmen von differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln in serumhaltigem Medium. Die Präparate wurden nur mit Osmiumtetroxid kontrastiert, um fehlinterpretierbare Artefakte zu vermeiden. Der blaue Rahmen kennzeichnet als Nanopartikel identifizierte Strukturen zwischen den Mikrovilli. Die dargestellten Elementanalysen zeigen Spektren der Mediumkontrolle und der Behandlung mit Silbernanopartikeln.

5.2 Zytotoxizität von Silbernanopartikeln

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Abhängigkeit der Zytotoxizität von verschiedenen Eigenschaften der Silbernanopartikel und des Testsystems näher betrachtet. Dafür wurde eine Kombination zweier Zytotoxizitätsassays im 96-*well* Format gewählt. Dabei handelt es sich zum einen um eine Messung der Stoffwechselaktivität der Zellen (CellTiter-Blue® - Cell Viability Assay, CTB Assay) und die anschließende indirekte Bestimmung der Zellzahl über eine Zellkernfärbung (DAPI Färbung).

5.2.1 Einfluss des Zellkulturmediums auf die Zytotoxizität

In den ersten Versuchen wurden proliferierende sowie differenzierte Caco-2 Zellen verwendet, um den Einfluss der Zusammensetzung des zur Inkubation verwendeten Zellkulturmediums zu untersuchen. Dafür wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit und ohne FCS inkubiert.

Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigen die Ergebnisse des CTB Assays und der DAPI Färbungen für die Tensid-stabilisierten Silbernanopartikel, Silberionen sowie der Beschichtungskontrolle in serumfreiem und serumhaltigem Zellkulturmedium für 4, 24 und 48 h an proliferierenden und differenzierten Caco-2 Zellen. Es zeigte sich ein konzentrations- und zeitabhängiger Effekt der Silbernanopartikel und -ionen auf die Viabilität und Zellzahl in beiden Zellstadien. Für alle Bedingungen hatte die Nanopartikelbeschichtung, in den für die Nanopartikel verwendeten Konzentrationen, keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität und Zellzahl. Lediglich in serumfreiem Medium auf proliferierenden Zellen zeigte die Beschichtung ab der höchsten Konzentration, die 50 µg/mL Silbernanopartikeln entspricht, einen Einfluss auf die Zellzahl nach 24 h. Es war zu erkennen, dass sich die Zytotoxizität von Silberionen bereits bei geringeren Mengen an eingesetztem Silbernitrat zeigte. Die Silbernanopartikel waren etwa um den Faktor 10 weniger toxisch. Der Vergleich der Inkubation in serumfreiem und serumhaltigem Medium (*Student`s* t-Test $p < 0{,}05$, signifikante Abweichungen gekennzeichnet mit #) zeigte nur geringe Unterschiede für die Silbernanopartikel auf proliferierenden Caco-2 Zellen und keine auf den differenzierten Caco-2 Zellen.

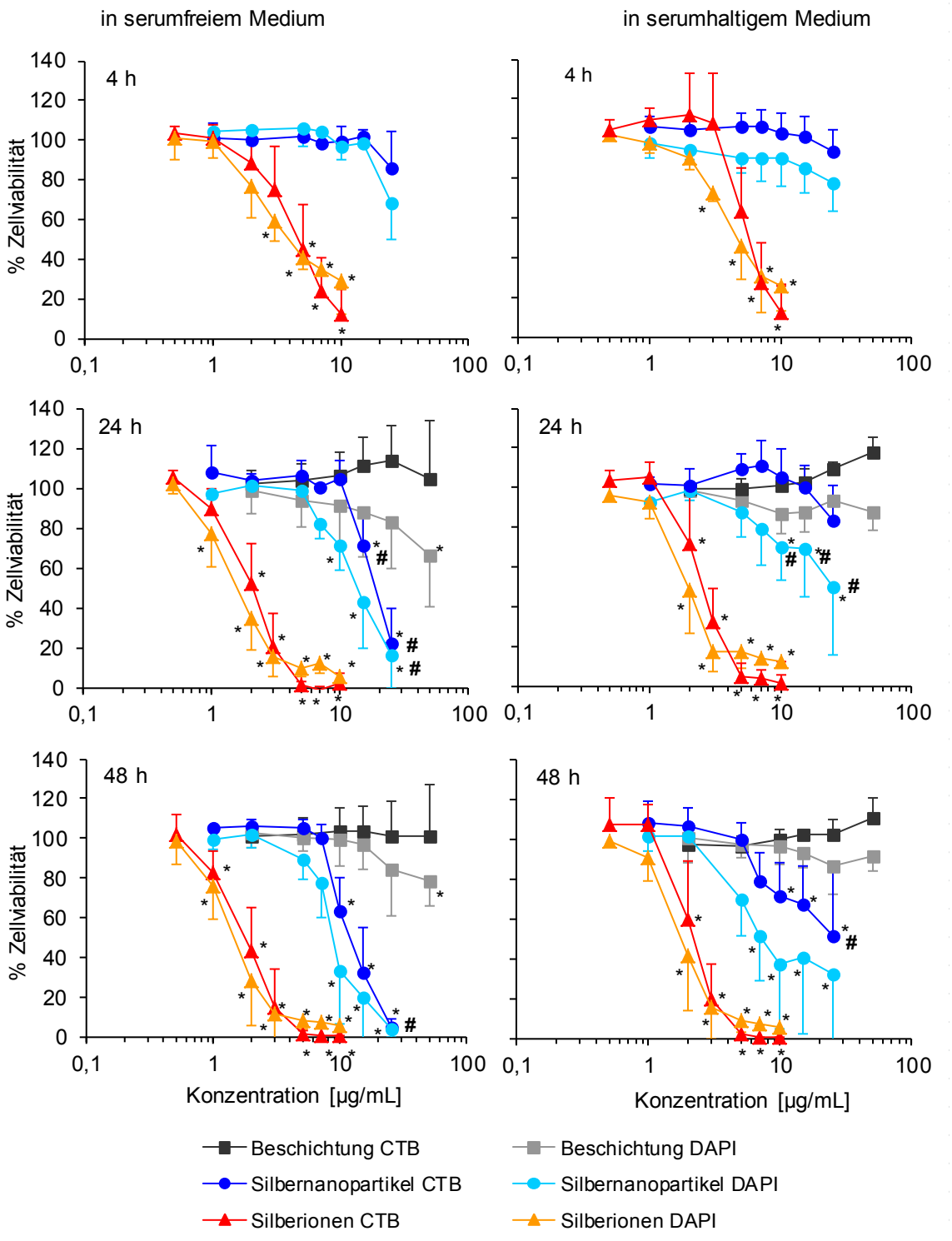

Abbildung 13: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 4, 24 und 48 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln sowie Beschichtungskontrolle und Silberionen. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h in 96-*well* Platten kultiviert und anschließend in einem Volumen von 100 µL/*well* inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Der Versuch wurde mindestens 3-mal reproduziert. Die mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant von der Mediumkontrolle und mit # gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant zwischen serumfreiem und serumhaltigem Medium (*Student`s* t-Test $p < 0,05$).

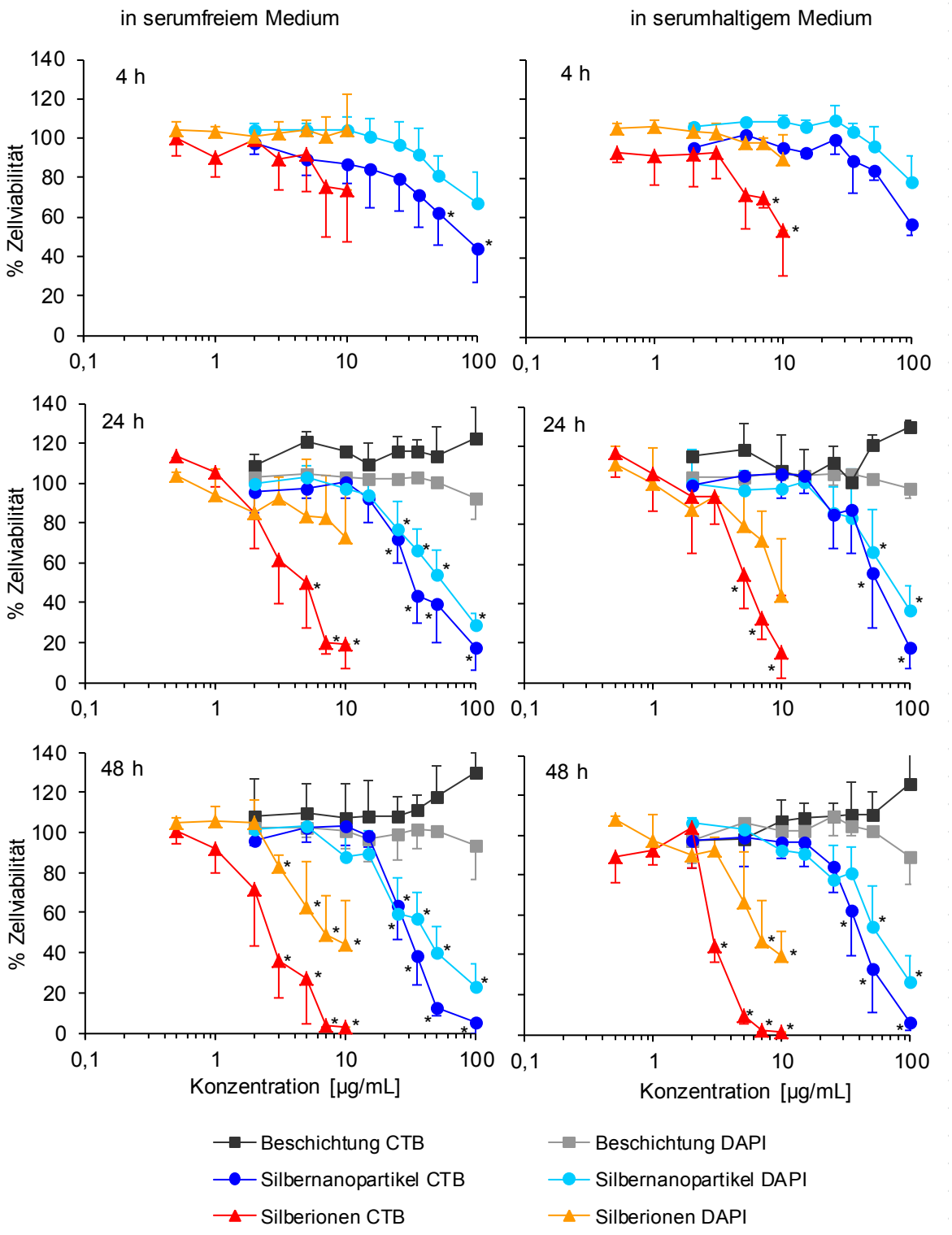

Abbildung 14: CTB Assay und DAPI Färbung an differenzierten Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 4, 24 und 48 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln sowie Beschichtungskontrolle und Silberionen. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 21 Tage in 96-*well* Platten differenziert und anschließend in je 300 µL inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3-mal reproduziert. Die mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant von der Mediumkontrolle und mit # gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant zwischen serumfreiem und serumhaltigem Medium (*Student`s* t-Test $p < 0,05$).

5.2.2 Einfluss des Inkubationsvolumens auf die Zytotoxizität

Da die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel in serumfreiem Medium keine stabile Suspension bildeten, sondern über die Zeit sedimentierten, stellte sich die Frage, ob das Inkubationsvolumen einen Einfluss hat. Für instabile Nanopartikelsuspensionen kamen bei größeren Inkubationsvolumina mehr Nanopartikel in Kontakt mit den Zellen. Andererseits waren die sedimentierten Nanopartikel aggregiert und agglomeriert und hatten dadurch eine geringere Oberfläche, die Ionen freisetzen oder mit den Zellen interagieren könnten. Zusätzlich war die Information, ob das Inkubationsvolumen einen Einfluss hatte, wichtig, um den Vergleich von differenzierten und proliferierenden Zellen richtig zu deuten.

Proliferierende Caco-2 Zellen wurden in einem Volumen von 100 µL/*well* inkubiert. Da jedoch die differenzierten Caco-2 Zellen aufgrund ihres erhöhten Mediumverbrauchs in 300 µL/*well* inkubiert werden mussten, stellte sich die Frage, ob dieser Unterschied im Inkubationsvolumen über den damit einhergehenden Unterschied in der verabreichten Nanopartikelmasse Einfluss auf die Testergebnisse hatte. Zur Überprüfung wurden die proliferierenden Caco-2 Zellen in weiteren Versuchen in 300 µL Medium inkubiert. Ein umgekehrter Versuchsansatz war nicht möglich, da die differenzierten Caco-2 Zellen mit 100 µL/*well* bei Inkubationszeiten von 24 bis 48 h unter einem Mangel an Nährstoffen und einem sinkenden pH-Wert litten. In Abbildung 15 ist der Vergleich der Inkubationsvolumina anhand eines CTB Assays und einer DAPI Färbung dargestellt und es zeigte sich für beide Zusammensetzungen des Zellkulturmediums, dass der Unterschied in der Zytotoxizität vor allem für die Silbernanopartikel, aber auch für die Silberionen, mit zunehmender Zeit stieg. Dabei war für die Inkubation in serumfreiem Medium nach 24 h noch kein Unterschied zu erkennen und nach 48 h ein geringer für die Nanopartikel. Es war zu beachten, dass die Tensid-stabilisierten Silbernanopartikel in serumfreiem Medium nicht stabil waren und sedimentierten, sodass bei gleicher Konzentration in einem größeren Volumen mehr Partikel auf die Zellen herabsanken als bei einem geringeren Volumen. Im Gegensatz dazu waren Silbernanopartikel in serumhaltigem Medium stabil, zeigten jedoch einen größeren Unterschied in der Zytotoxizität als in serumfreiem Medium. Dabei wurde mit steigendem Volumen und zunehmender Zeit die zu detektierende zelluläre Antwort sowohl im CTB Assay als auch durch die DAPI Färbung für Silbernanopartikel zu höheren Konzentrationen verschoben. Gleiches galt für Silbernitrat. Dieser Vergleich zum Einfluss der Inkubationsvolumina zeigte, dass sich die Zytotoxizität von proliferierenden und differenzierten Caco-2 Zellen zumindest für 24 h gegenüberstellen ließ und die beobachteten Unterschiede vornehmlich auf den Differenzierungsstatus und die Zellzahl zurückzuführen waren.

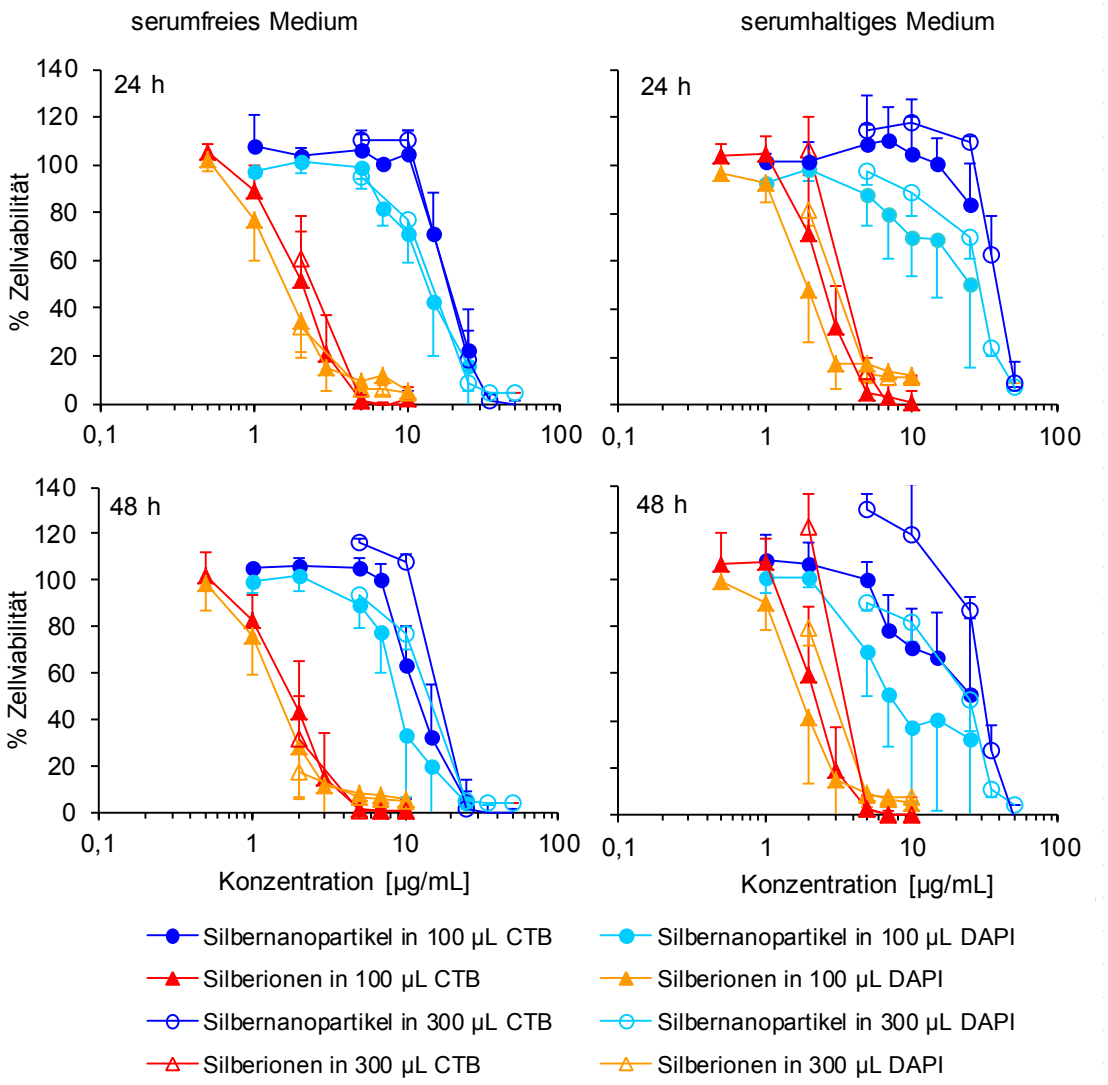

Abbildung 15: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in 100 und 300 µL Inkubationsvolumen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 und 48 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln und Silberionen. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h in 96-*well* Platten kultiviert und anschließend in je 100 oder 300 µL/*well* inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

5.2.3 Einfluss der Zelllinie auf die Zytotoxizität

Ein weiterer Faktor, der das Ergebnis von Zytotoxizitätsmessungen beeinflussen kann, ist die verwendete Zelllinie. Daher wurde die Toxizität von Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln bei 3 weiteren Zelllinien gemessen. Neben der Zelllinie Caco-2 wurde die Zytotoxizität der Tensid-beschichteten Silbernanopartikel und Silberionen auch an der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2, der mucussezernierenden humanen Darmkrebszelllinie HT-29/B6 sowie der Lymphozytenzelllinie Raji getestet. In der folgenden Abbildung 16 sind diese Ergebnisse im Vergleich zu den Caco-2 Zellen dargestellt. Es war für alle Zelllinien ein zeit- und konzentrationsabhängiger Abfall der Zellviabilität und der Zellzahl zu erkennen. Dabei fiel die Kurve für alle Zelllinien für die Silberionen früher ab als für die Silbernanopartikel, mit einem

Abstand von etwa einem Faktor von 10. Der Vergleich unterschiedlicher Zelllinien zeigte eine Varianz in der Empfindlichkeit der verschiedenen Zelllinien. Die Umrechnung der Konzentration von Masse/Volumen in Masse/Wachstumsfläche oder Masse/Zellzahl führte jedoch zu Änderungen in den Verhältnissen, wie in Abbildung 17 dargestellt. In die Umrechnung floss die Wachstumsfläche eines 96-*well* Platten-*well*s von 0,32 cm^2 und die geschätzte Zellzahl zum Zeitpunkt der Inkubation ein (10 000 Raji, 20 000 proliferierenden Caco-2 und HT-29/B6, 40 000 HepG2 und 130 000 differenzierte Caco-2). Die beobachteten Unterschiede waren somit nicht nanopartikelspezifisch und abhängig von der Darstellung und Konzentrationsangabe.

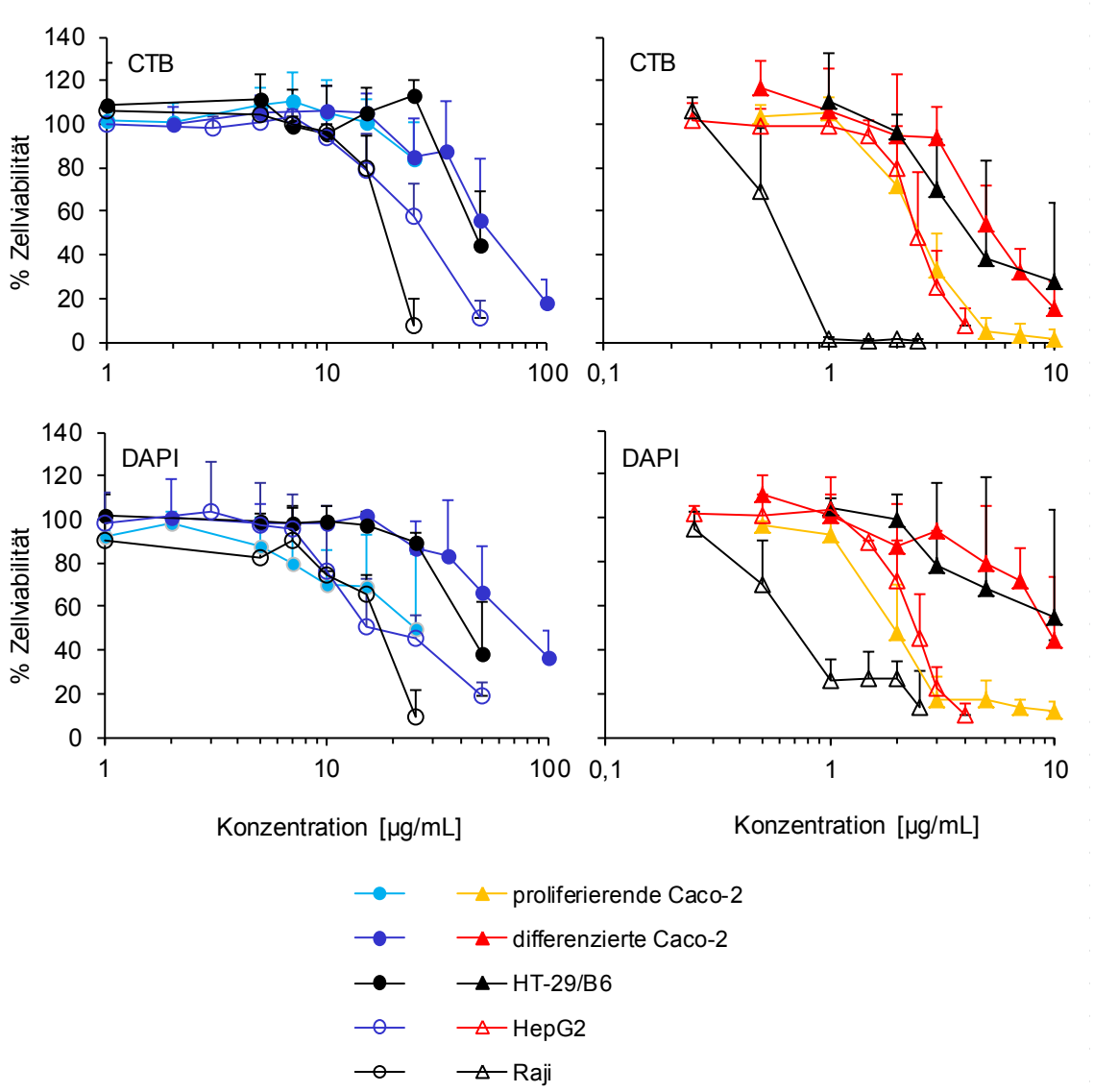

Abbildung 16: Vergleich der Zytotoxizität von proliferierenden und differenzierten Caco-2 sowie HepG2, HT-29/B6 und Raji Zellen mittels CTB Assay und DAPI Färbung in serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln sowie Silberionen. 10 000 Zellen/*well* jeder Zelllinie wurden in 96-*well* Platten ausgesät und die adhärenten Zellen 24 h kultiviert, bzw. die Caco-2 Zellen 21 Tage differenziert. Anschließend wurden die Zellen inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3-mal reproduziert.

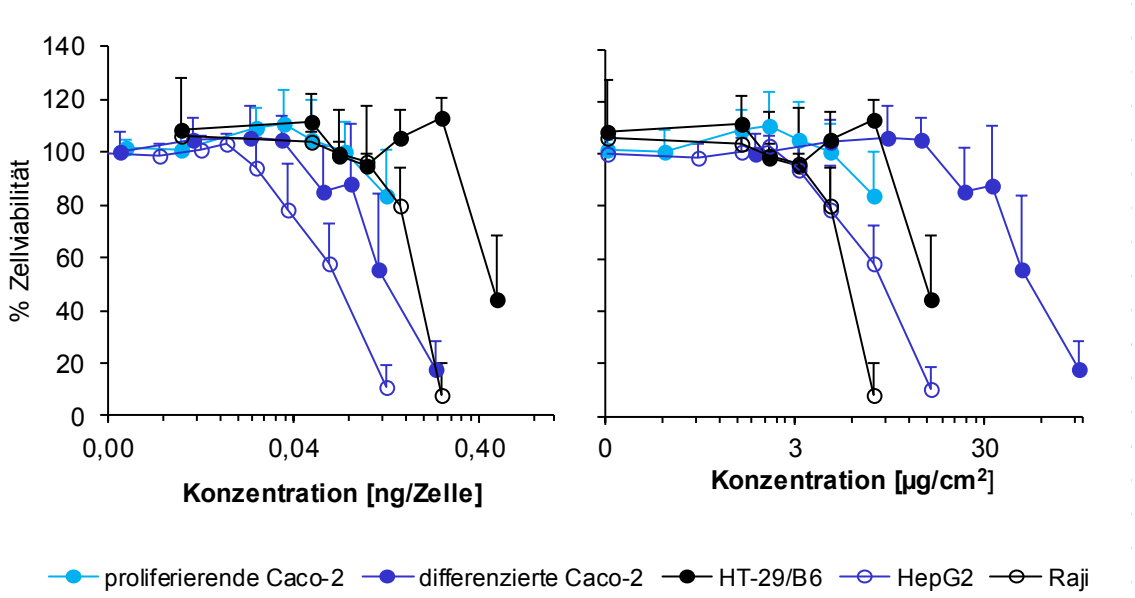

Abbildung 17: Vergleich der Zytotoxizität der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von der Konzentrationsangabe. 10 000 Zellen/*well* der Caco-2, HT-29/B6 und Raji Zellen und 20 000 Zellen/*well* der HepG2 Zellen wurden in 96-*well* Platten ausgesät und die adhärenten Zellen 24 h kultiviert, bzw. die Caco-2 Zellen 21 Tage differenziert. Anschließend wurden die Zellen mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln in serumhaltigem Medium inkubiert und nach 24 h die Zellviabilität mittels CTB Assay bestimmt. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3-mal reproduziert. Die Umrechnung der eingesetzten Konzentrationen von Masse/Volumen in Masse/Wachstumsfläche und Masse/Zelle erfolgte mithilfe der Fläche eines 96-*well* Platten *well*s und der geschätzten Zellzahl zum Zeitpunkt der Inkubation.

5.2.4 Einfluss der Nanopartikelbeschichtung auf die Zytotoxizität

Da auch die Eigenschaften der Nanopartikel einen Einfluss auf ihre Zytotoxizität haben können, wurde in weiteren Experimenten der Einfluss der Beschichtung von Silbernanopartikeln untersucht. Dafür wurden zusätzlich zu den Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln weitere Silbernanopartikel einer vergleichbaren Größe mit Beschichtungen aus Tannin, PVP oder dem Tripeptid Cystein-Lysin-Lysin im Zellviabilitätsassays verwendet. Um zusätzlich einen Alltagsbezug zu schaffen, wurde ein kommerziell erhältliches Nahrungsergänzungsmittel ebenfalls untersucht.

In Abbildung 18 ist der Vergleich der Zytotoxizität von Silbernanopartikeln vergleichbarer Größe mit unterschiedlicher Beschichtung sowie einem kommerziell erhältlichen Nahrungsergänzungsmittel dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sämtliche Nanopartikel im CTB Assay einen vergleichbaren Kurvenverlauf hatten. Nur das Nahrungsergänzungsmittel zeigte bereits bei geringeren Konzentrationen eine Wirkung auf den Stoffwechsel der Zellen. In der DAPI Färbung zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch war auch ein Unterschied zu den Peptid-beschichteten Silbernanopartikeln zu erkennen.

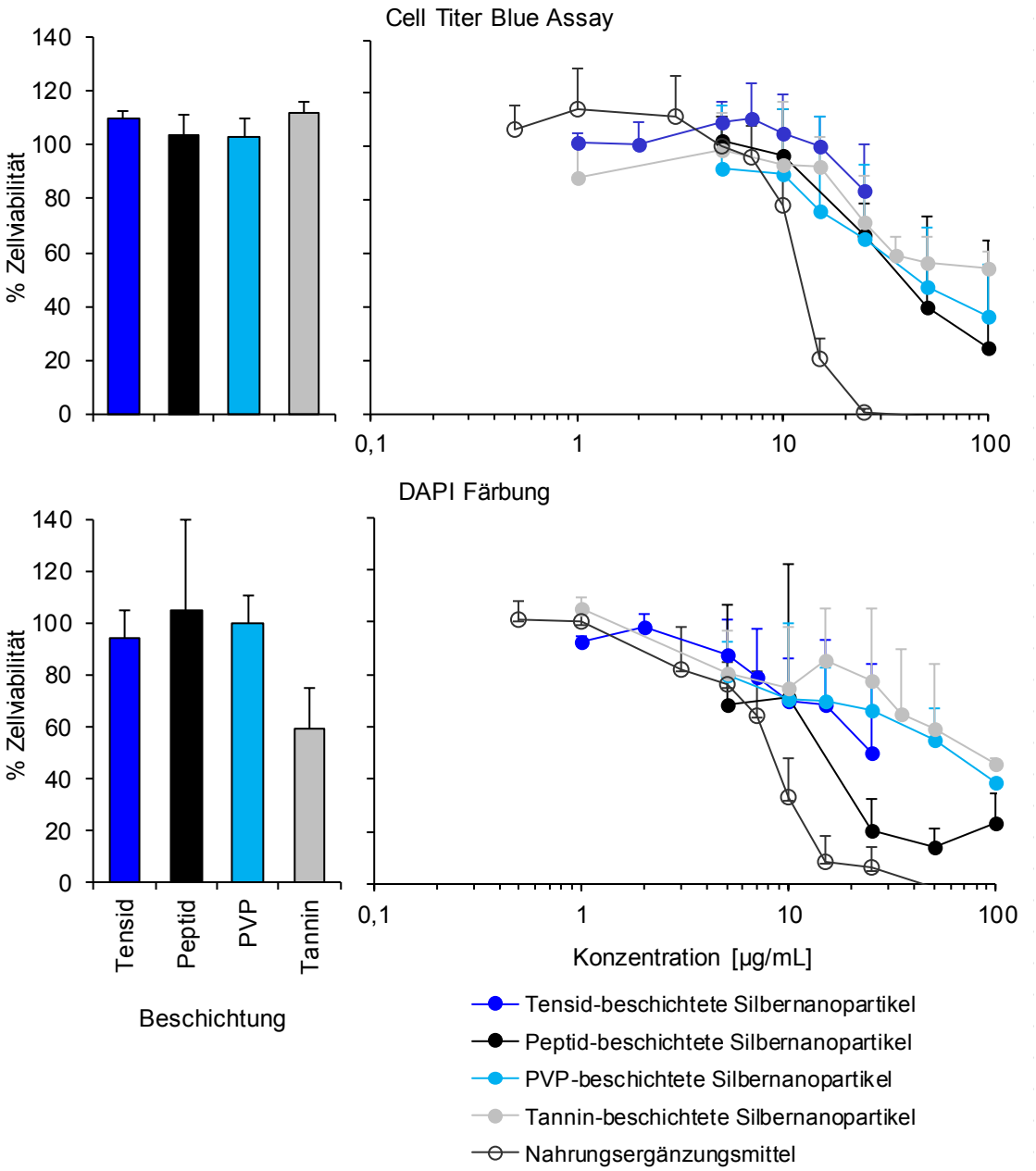

Abbildung 18: Vergleich der Zytotoxizität von Silbernanopartikeln mit unterschiedlicher Beschichtung. CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-, Peptid-, PVP- und Tannin-beschichteten Silbernanopartikeln sowie einem kommerziell erhältlichen Nahrungsergänzungsmittel. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h in 96-*well* Platten kultiviert und anschließend in je 100 µL inkubiert. Der Wert für die Beschichtungskontrollen entspricht für die Peptid- und Tensid-beschichteten Nanopartikel dem Gehalt der höchsten Nanopartikelkonzentration und für Tannin und PVP ist etwa die 3 bis 5 fache Menge der höchsten Nanopartikelkonzentration dargestellt. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3-mal reproduziert.

5.3 Wirkungsmechanismus von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Wirkungsmechanismus der Silbernanopartikel genauer betrachtet. Dafür wurden überwiegend mit den Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln weitergehende mechanistische Untersuchungen durchgeführt.

5.3.1 Einfluss der Ionenfreisetzung der Silbernanopartikel

Um die Frage zu klären, ob die zytotoxische Wirkung der Silbernanopartikel durch die von ihnen freigesetzten Ionen vermittelt wurde, war es wichtig zu wissen, wie viele Silberionen von den Nanopartikeln unter den Bedingungen, die auch während der Inkubation der Zellen herrschen (Zellkulturmedium, 37 °C), freigesetzt wurden. Für die Untersuchung der Ionenfreisetzung wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde das Medium nach Inkubation mit Nanopartikeln mittels Ultrazentrifugation von den Partikeln und nicht löslichen Silberverbindungen getrennt. Zum anderen wurde diese Trennung mittels Gleichgewichtsdialyse erreicht.

5.3.1.1 Trennung von Partikel und Ionen mittels Zentrifugation

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Ionenfreisetzungsuntersuchungen der Tensid-beschichteten Silbernanopartikel im Vergleich zu Silbernitrat dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei der direkten Zugabe von Silberionen ins Zellkulturmedium nur ein Teil des eingesetzten Silbers im Zentrifugationsüberstand oder auf der anderen Seite der Dialysemembran zu finden war. So fand sich mit zunehmender Konzentration prozentual weniger gelöstes Silber. Es ist bekannt, das Silberionen vor allem mit Schwefel und Selen schwer lösliche Verbindungen bilden und mit Chloridionen als Silberchlorid ausfallen [Chernousova und Epple, 2013]. Zellkulturmedien sind komplexe Gemische aus Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und weiteren Komponenten. Für diese Inhaltsstoffe sind diverse Reaktionen mit Silberionen denkbar. Offensichtlich wurde daher auch in den Silbernitratproben nur ein Teil der eingesetzten Silberionen in der Lösung gefunden. Der Anteil der gelösten Silberionen erhöhte sich in den Silbernitratproben mit steigenden Konzentrationen, jedoch ergab sich kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten und der gelösten Silberkonzentration. Für die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel war ebenfalls ein Anstieg der Ionenkonzentrationen im Medium in Abhängigkeit von der eingesetzten Partikelmenge zu beobachten. Auch hier zeigte sich zwischen beiden Parametern kein proportionaler Zusammenhang. Der Zusatz von FCS zum Zellkulturmedium verringerte weder in den Silbernitrat-Proben noch in den Partikelproben maßgeblich die Silberionenkonzentration. Insgesamt lieferte die Ultrazentrifugation leicht höhere

Werte für die Konzentration der gelösten Silberionen als die Dialysemethode, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

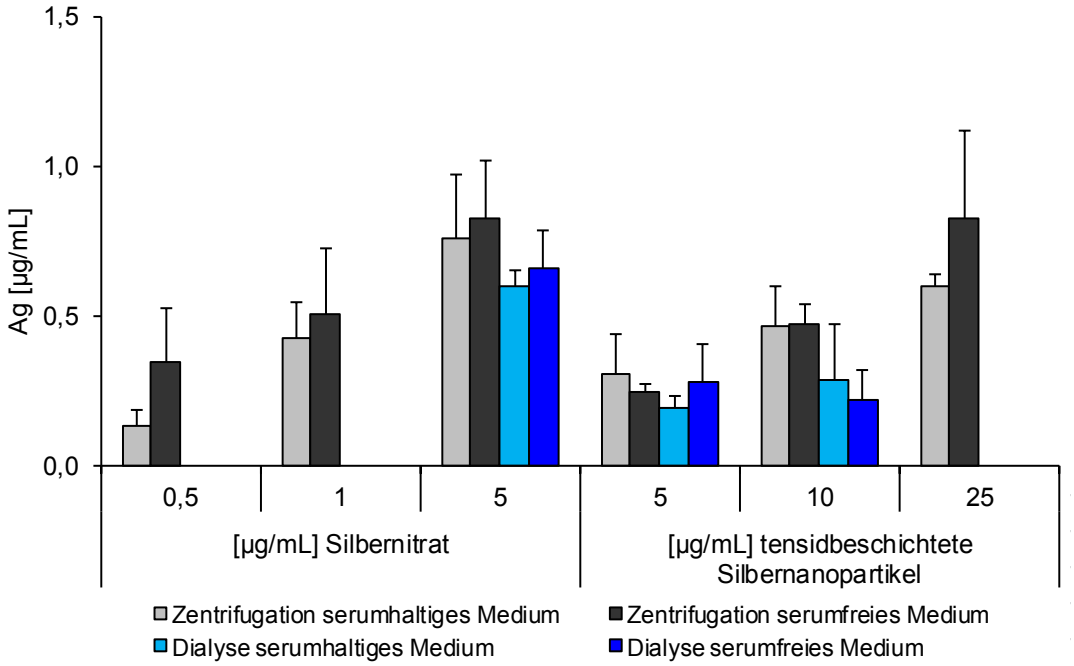

Abbildung 19: Untersuchung der Silberionenfreisetzung von Silbernanopartikeln in serumhaltigem und serumfreiem Zellkulturmedium. Tensid-beschichtete Silbernanopartikel wurden 24 h in Zellkulturmedium bei 37 °C im Dunkeln (Zellkulturschrank) inkubiert. Die Trennung von gelösten Silberionen und Nanopartikeln (sowie abzentrifugierten oder durch die Dialysemembran zurückgehaltenen Silberverbindungen), erfolgte entweder über eine anschließende Ultrazentrifugation oder kontinuierlich während der Inkubation über eine Dialysemembran. Es wurden nicht alle dargestellten Konzentrationen mittels Dialyse untersucht. Zum Vergleich wurden Silberionen in den Versuchsaufbauten mitgeführt. Zur Bestimmung des Silbergehaltes wurden die Proben mittels Hochdruckmikrowellenaufschluss für die ICP-MS Analyse vorbereitet.

Abbildung 20 zeigt den Vergleich der Ionenfreisetzung aus Silbernanopartikeln in Abhängigkeit von der Beschichtung. Es ist zu erkennen, dass die drei untersuchten Silbernanopartikel mit Tensid-, Tannin und PVP-Beschichtung vergleichbare Mengen an Ionen freisetzten, während das als Nahrungsergänzungsmittel verkaufte Produkt deutlich mehr Ionen abgab.

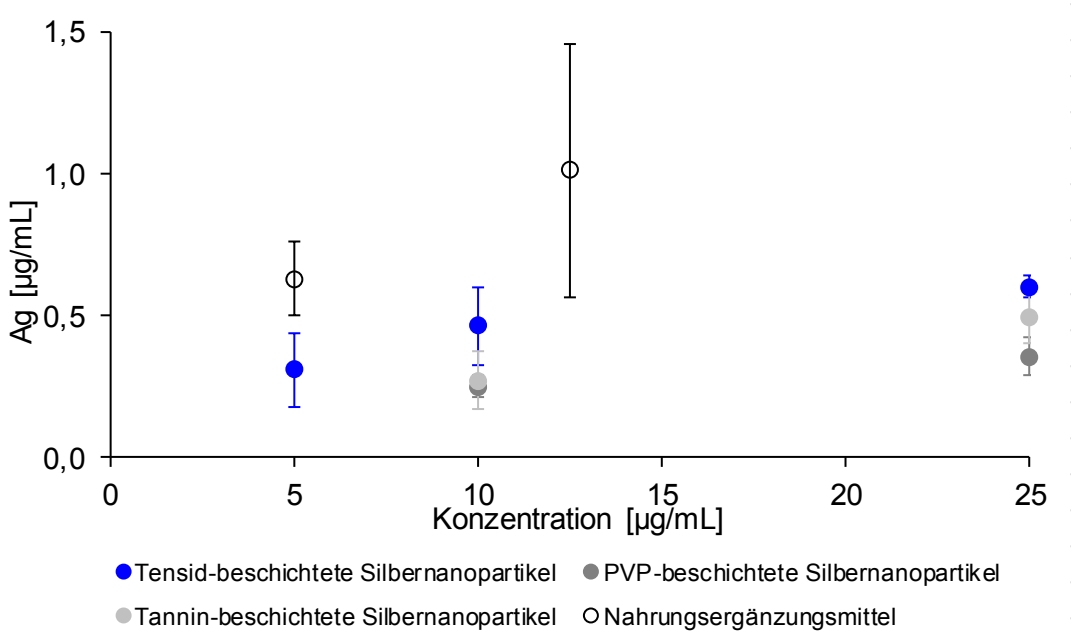

Abbildung 20: Untersuchung der Silberionenfreisetzung von Silbernanopartikeln in serumhaltigem Zellkulturmedium. Verschiedene Silbernanopartikel wurden 24 h in Zellkulturmedium bei 37 °C im Dunkeln (Zellkulturschrank) inkubiert. Die Trennung von Silberionen und Nanopartikel sowie unlöslichen Silberverbindungen erfolgte anschließend über Ultrazentrifugation. Zur Bestimmung des Silbergehaltes wurden Proben mittels Hochdruckmikrowellenaufschluss vorbereitet und mittels ICP-MS Analyse untersucht.

Zur indirekten Messung der Silberionenkonzentration über Effekte auf die Zellviabilität wurde die Testkombination CTB Assay und DAPI Färbung verwendet. Dafür wurden die Nanopartikel oder Silbernitrat 24 h in serumfreiem und serumhaltigem Zellkulturmedium bei 37 °C im Dunkeln vorinkubiert und anschließend ultrazentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde dann im Vergleich zu frisch angesetzten Nanopartikelsuspensionen oder Silbernitratlösungen auf die Zellen gegeben. In Abbildung 21 ist der Vergleich der Zytotoxizität der Tensid-beschichteten Silbernanopartikel oder Silbernitrat im Vergleich zur Toxizität des Zentrifugationsüberstandes dieser Nanopartikel oder des Silbernitrats nach 24 h Vorinkubation in Zellkulturmedium dargestellt. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Kurvenverlauf zwischen Nanopartikeln oder Silbernitrat und dem Zentrifugationsüberstand. Während die frisch angesetzten Nanopartikelsuspensionen oder Silbernitrat einen konzentrationsabhängigen Effekt im CTB Assay und der DAPI Färbung zeigten, schwankten die Messwerte des Zentrifugationsüberstands lediglich um den Wert der Mediumkontrolle.

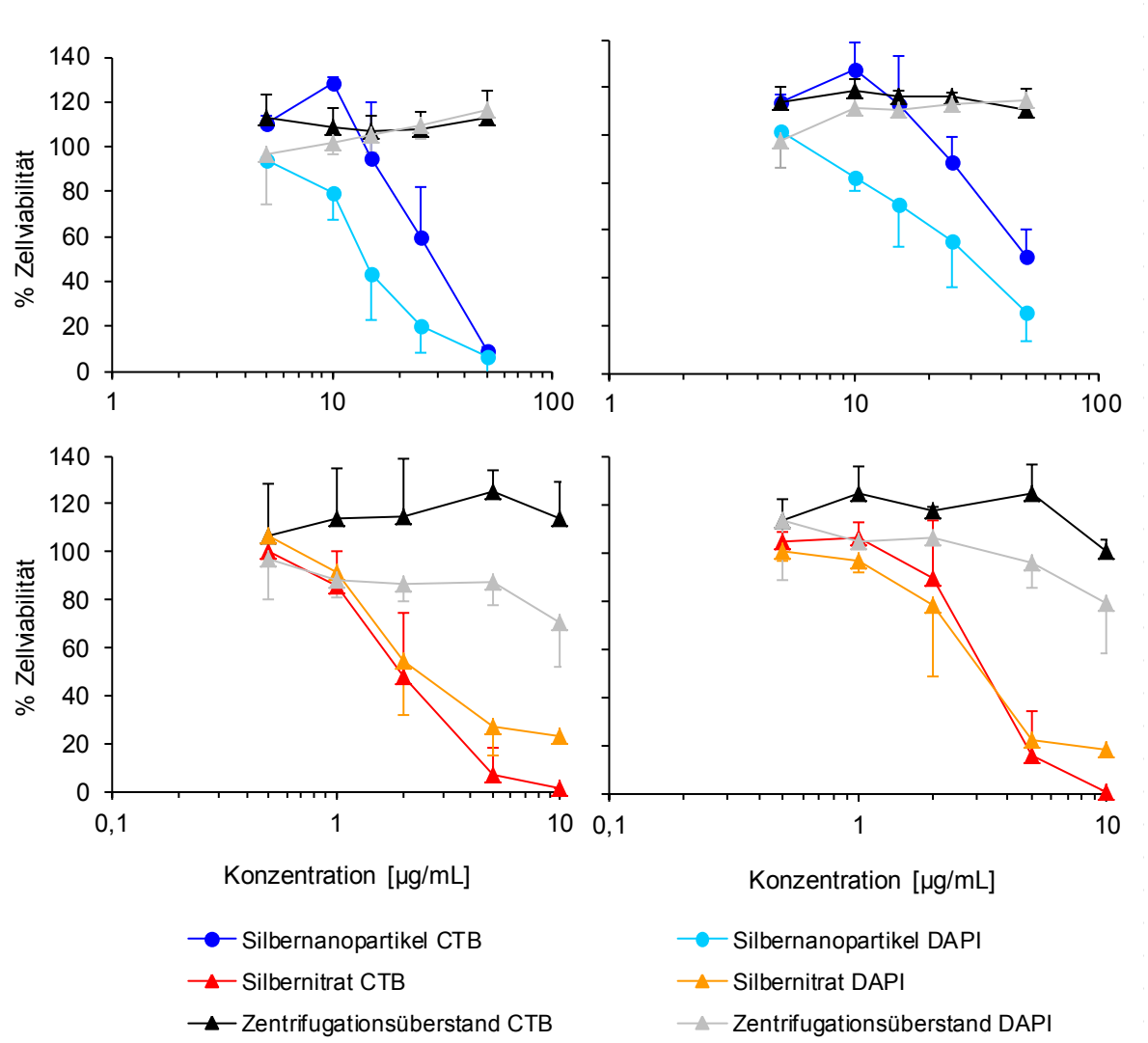

Abbildung 21: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln oder Silbernitrat sowie dem Zentrifugationsüberstand der 24 h in Zellkulturmedium vorinkubierten Silbernanopartikeln oder Silbernitrat. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h in 96-*well* Platten kultiviert und anschließend mit je 100 µL inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3-mal reproduziert.

5.3.1.2 Trennung von Partikeln und Ionen mittels Dialyse

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die aus den Partikeln freigesetzten Silberionen die mRNA-Expression der Caco-2 Zellen beeinflussen. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit den Partikeln und dem Beschichtungsreagenz inkubiert. Als Indikatoren für den Effekt wurden Gene ausgewählt, die für Proteine codieren, die mit den folgenden zellulären Reaktionen in Verbindung standen: In die Kategorie Stress und Entzündung fielen die Hämoxygenase 1 (HMOX1), das Hitzeschockprotein HSPA6, Albumin (ALB) und die für Transkriptionsfaktoren codierenden Gene FOS und NFE2L2 sowie deren Regulator KEAP1. In der Kategorie zelluläre Morphologie und Bewegung befanden sich die beiden strukturgebenden Proteine β-Aktin (ACTB), Tubulin β3

(TUBB3) und die für die Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten verantwortlichen Proteine Ocludin (OCLN), Claudin (CLDN3), Cadherin (CDH6) und Integrin (ITGA2) sowie die Tyrosinkinase PTK2. Die dritte Kategorie beinhaltete Moleküle, die in die Calciumhomöostase involviert waren, wie den Chemokinrezepror CXCR4, das Enzym ATP2C2, den Ionenkanalrezeptor ITPR2, Calmodulin (CALM3) und die calciumabhängige Proteinkinase CAMK2D. Zusätzlich diente der Versuch dem Vergleich der Wirkung von Silbernanopartikeln in serumhaltigem und serumfreiem Medium.

Die folgenden Tabelle 4 und Tabelle 5 zeigen die untersuchte differenzielle Genexpression. Für die Gene PTK2, CDH6, CALM3, ITPR2, ATP2C2, NFE2L2 und KEAP1 wurden keine signifikanten Regulationen im Vergleich zur Mediumkontrolle gemessen und die Ergebnisse in den folgenden Tabellen nicht dargestellt. Es ließ sich eine schwache Tendenz zu einer reduzierten Wirkung der Silbernanopartikel in serumfreiem Medium im Vergleich zu serumhaltigem Medium erkennen. Dies war jedoch nicht systematisch oder statistisch signifikant. Der Vergleich von Silbernanopartikeln und der durch sie freigesetzten Ionen zeigte eine deutliche Regulation einiger Gene, die in sehr abgeschwächter Form auch für die Ionen erkennbar war.

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen *real time* RT-PCR Analyse der differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Silberionen in Form von Silbernanopartikeln, die durch eine Dialysemembran von den Zellen getrennt wurden, und der Beschichtung der Nanopartikel in serumhaltigem Medium. Rot markierte Felder kennzeichnen eine Hochregulation von mindestens 2 im Vergleich zur Mediumkontrolle und grüne Felder eine Runterregulation von mindestens -2 der Genexpression im Vergleich zur Mediumkontrolle. Mit * markierte Werte zeigen an, dass sich der dazugehörige Wert signifikant von der Mediumkontrolle unterscheidet (*Student`s* t-Test $p < 0,05$).

		serumhaltiges Inkubationsmedium					
Kategorie	Gen	Silbernanopartikel		Silberionen		Beschichtung	
		5 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
Stress und Entzündung	**ALB**	* -2,1					
	HSPA6	238,0	358,2	4,2			
	HMOX1	* 51,3	* 105,2	3,4	2,0		2,1
zelluläre Morphologie und Bewegung	**FN1**						* 2,3
	OCLN	* -2,1	* -3,1				
	CLDN3		* -2,2				
	TJP3		* -2,4				
	ACTB	* 2,2	* 2,9				
	FOS	* 4,0	* 8,7				
	ITGA2	* 3,1	* 3,3			2,2	
	TUBB3	* 29,8	* 44,1	3,5	2,3		2,6
Calcium-homöostase	**CXCR4**	2,4	4,8		2,9		2,7
	CAMK2D		* -2,5				

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen *real time* RT-PCR Analyse der differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Silberionen in Form von Silbernanopartikeln, die durch eine Dialysemembran von den Zellen getrennt wurden, und der Beschichtung der Nanopartikel in serumfreiem Medium. Rot markierte Felder kennzeichnen eine Hochregulation von mindestens 2 im Vergleich zur Mediumkontrolle und grüne Felder eine Runterregulation von mindestens -2 der Genexpression im Vergleich zur Mediumkontrolle. Mit * markierte Werte zeigen an, dass sich der dazugehörige Wert signifikant von der Mediumkontrolle unterscheidet (Student`s t-Test $p < 0,05$).

		serumfreies Inkubationsmedium					
Kategorie	Gen	Silbernanopartikel		Silberionen		Beschichtung	
		5 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
Stress und Entzündung	**ALB**		* -2,9			* -2,3	
	HSPA6	* 23,5	466,4	2,1	4,1		* 4,7
	HMOX1	4,8	* 77,2				* 2,0
zelluläre Morphologie und Bewegung	**FN1**						
	OCLN					2,0	2,7
	CLDN3						
	TJP3						2,1
	ACTB		2,1				
	FOS		* 6,3				
	ITGA2						
	TUBB3	2,6	20,0				
Calcium-homöostase	**CXCR4**	2,4	* 5,1				
	CAMK2D						

5.3.2 Einfluss auf die Morphologie der Caco-2 Zellen

Da die mikroskopische Betrachtung der Zellen sowohl bei der Kultivierung als auch bei der Inkubation für diverse Assays gängig ist, fielen bereits bei den Zytotoxizitätsmessungen morphologische Veränderungen der Zellen auf.

Mikroskopische Beobachtungen der mit Silbernanopartikeln und Silberionen inkubierten Zellen zeigten morphologische Veränderungen. Wie in Abbildung 22 exemplarisch für 24 h dargestellt, konnte vor allem bei den proliferierenden Caco-2 Zellen ein Ablösen der Zellen vom Zellkulturgefäßboden und von den Nachbarzellen beobachtet werden, welches mit dem Einnehmen einer runden Gestalt und einer Erhöhung des Kontrastes der Zellumrandungen in der mikroskopischen Ansicht einherging. Von diesen Veränderungen waren vor allem Zellen am Rand von Zellverbänden betroffen. Die Beobachtung morphologischer Veränderungen von differenzierten Caco-2 Zellen war aufgrund des dichten Monolayers weniger eindeutig als bei den proliferierenden Zellen. Es konnte aber bei höheren Konzentrationen an Silber eine Zerstörung des Monolayers und das Entstehen von Lücken sowie ebenfalls ein Abkugeln der Zellen beobachtet werden.

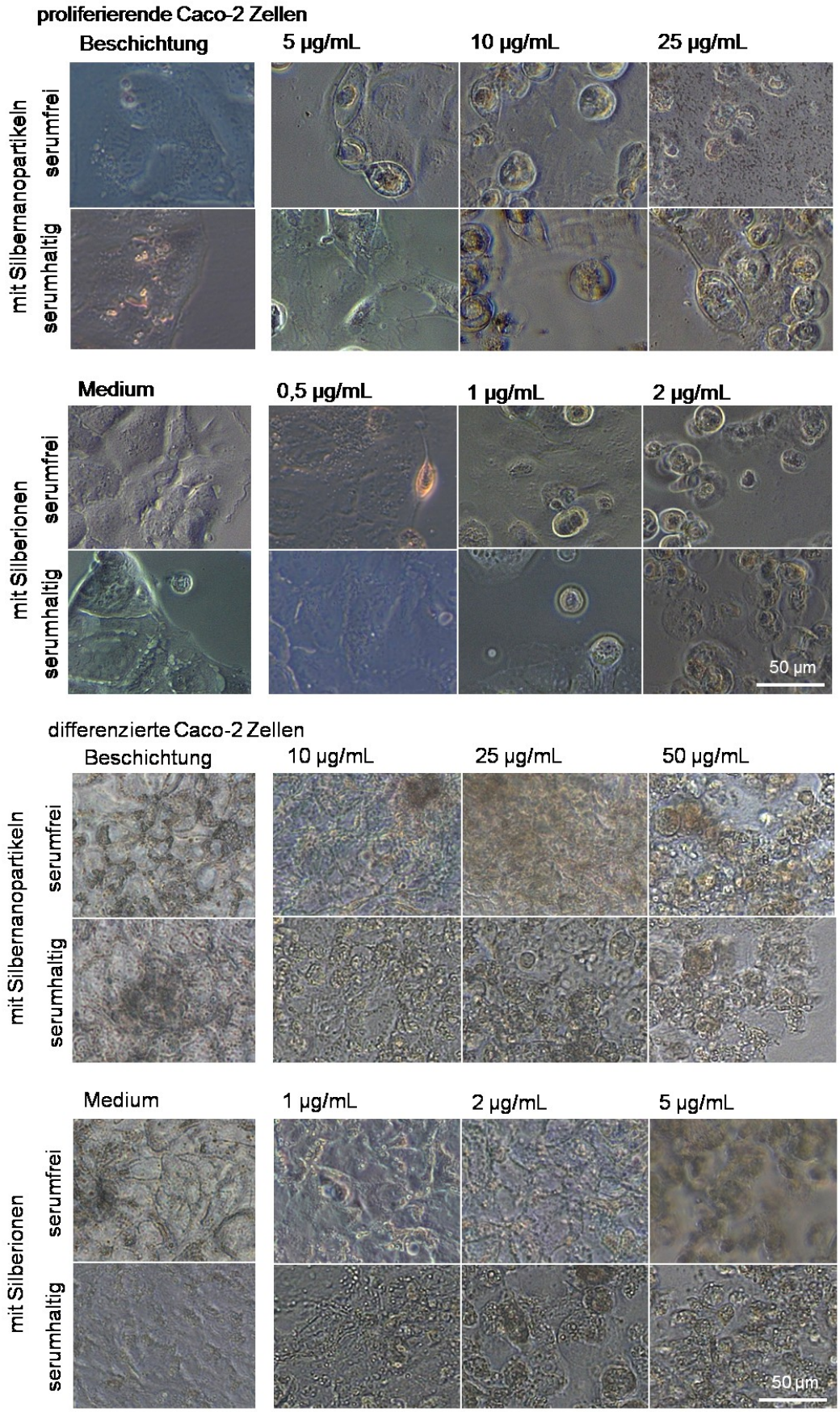

Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen von proliferierenden und differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Silberionen und Beschichtungskontrolle in serumfreiem und serumhaltigem Medium.

5.3.3 Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Reaktion der Caco-2 Zellen

Die bisher verwendeten Assays waren Endpunktmessungen. Um zusätzlich einen Überblick über den Zeitverlauf der zellulären Reaktion auf die Silberspezies zu gewinnen, wurden Wachstumskinetiken mittels Messung des Wechselstromwiderstands (Impedanz) wachsender Zellen aufgenommen. Die Impedanz einer wachsenden Zellkultur wird von der Zellzahl, der Zellmorphologie und der Zelladhäsion an der Oberfläche der Elektrode beeinflusst. Diese Parameter fließen in die Berechnung eines als Zellindex bezeichneten elektrischen Widerstandes ein, in dem die Messung dargestellt wird.

Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen die Ergebnisse der Impedanzmessung von proliferierenden und differenzierten Caco-2 Zellen, die mit Silberionen, Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und der entsprechenden Beschichtungskontrolle inkubiert wurden. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle und den Zeitpunkt der Inkubation bezogen dargestellt. Die Beschichtung aus Tween 20 und Tagat TO zeigte weder auf die Impedanz proliferierender noch auf die Impedanz differenzierter Zellen einen Einfluss. Bei den Silberionen und Silbernanopartikeln war ein konzentrations- und zeitabhängiger Effekt auf die Impedanz zu erkennen. Dabei war in den ersten 6 bis 12 h vor allem in den Kurven für die differenzierten Zellen in serumfreiem Medium ein deutlicher Anstieg der Impedanz im Vergleich zur Mediumkontrolle zu beobachten, dem ein kontinuierlicher Abfall der Kurven folgte. Der Anstieg der Impedanz erfolgte mit zunehmender Konzentration an Silber früher und teilweise stärker, gefolgt von einem schnelleren und tieferen Abfall. Bei den differenzierten Zellen zeigte sich eine schnellere Reaktion als bei den proliferierenden Zellen mit einem anschließend gleichbleibenden Niveau der Impedanz. Während proliferierende Zellen in serumhaltigem Medium im Vergleich zu solchen in serumfreiem Medium eine geringere Reaktion auf Silber zeigten, war für differenzierte Zellen in serumhaltigem Medium eine deutlichere Reaktion als in serumfreiem Medium zu erkennen.

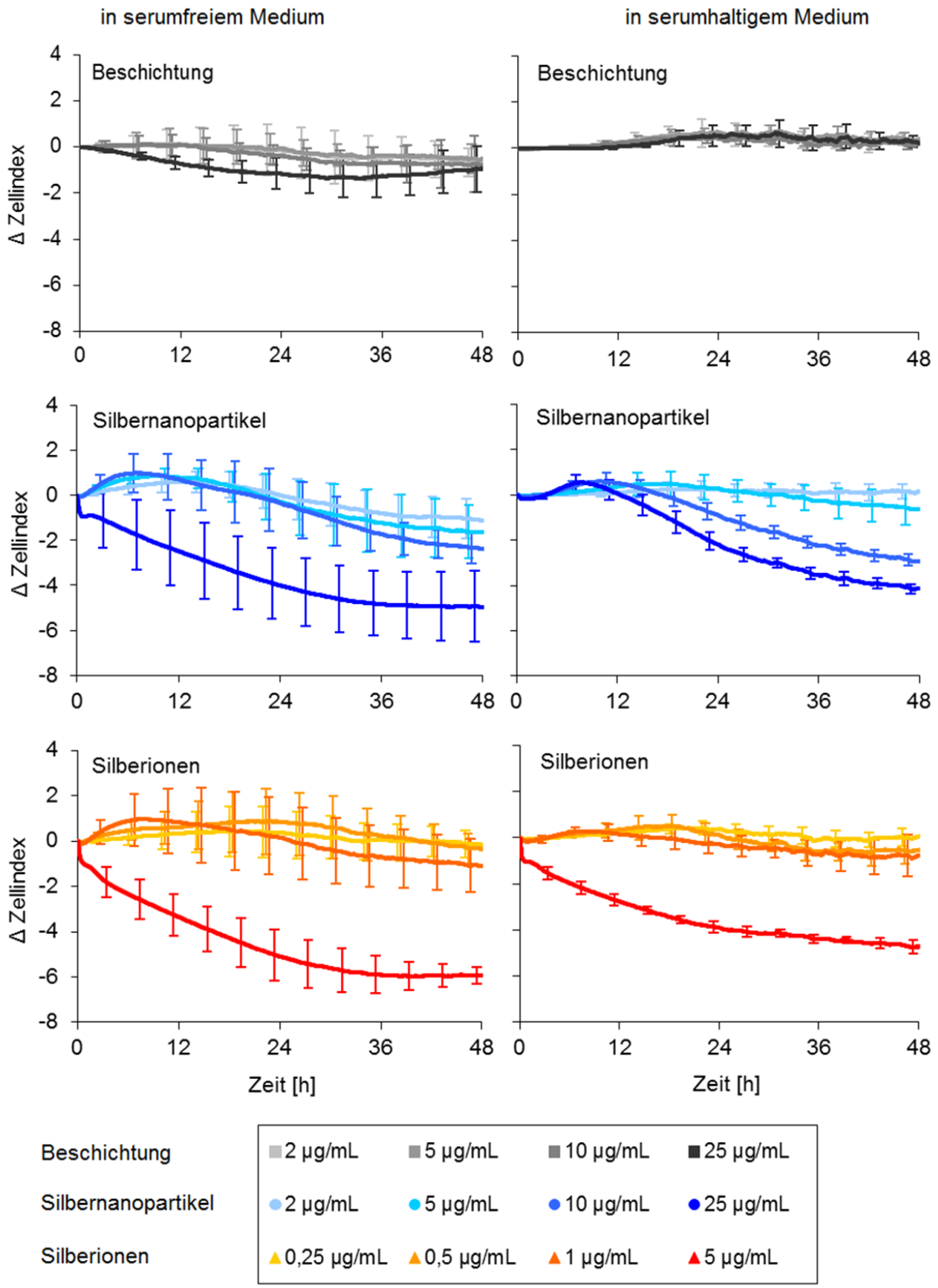

Abbildung 23: Impedanzmessung an proliferierenden Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium über eine Inkubationszeit von 48 h mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln, Silberionen sowie der Beschichtungskontrolle. 6 125 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h in E-Plates kultiviert und anschließend in je 100 µL inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle und den Zeitpunkt der Inkubation bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 2-mal reproduziert.

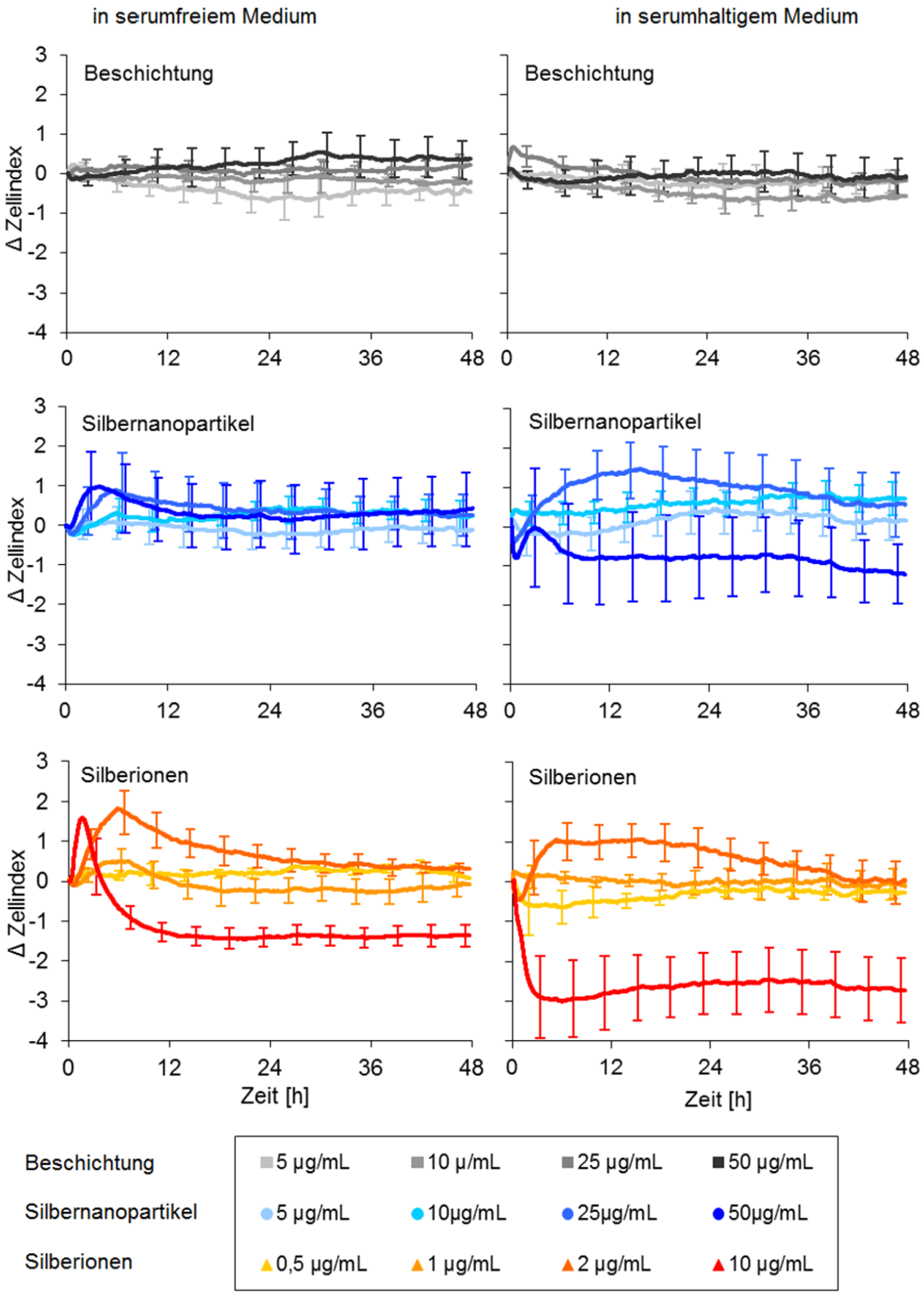

Abbildung 24: Impedanzmessung an differenzierten Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium über eine Inkubationszeit von 48 h mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln, Silberionen sowie der Beschichtungskontrolle. 6 125 Caco-2 Zellen/*well* wurden 21 Tage in E-Plates differenziert und anschließend in je 200 µL/*well* inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle und den Zeitpunkt der Inkubation bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 2-mal reproduziert.

5.3.4 Induktion von Apoptose in Cac-2 Zellen

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde anhand von zwei Zytotoxizitätsassays bereits gezeigt, dass die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel einen konzentrations- und zeitabhängigen zytotoxischen Effekt auf Caco-2 Zellen hatten. Dies warf im Zusammenhang mit den morphologischen Veränderungen der Zellen die Hypothese auf, dass die Zellen durch Anoikis starben. Dies ist eine spezielle Form der Apoptose, die durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes ausgelöst wird, sich jedoch ebenfalls anhand typischer Apoptosemessungen, wie der Messung der Caspaseaktivität oder der Annexin V Färbung, bestimmen lässt [Frisch und Francis, 1994; Chiarugi und Giannoni, 2008; Engbers-Buijtenhuijs *et al.*, 2005].

In Abbildung 25 ist das Ergebnis der Messung der Caspaseaktivität mittel Image-iT und Caspase Glo® Kit dargestellt. Beide Kits messen die Aktivität der Caspase 3 und 7 mittels fluoreszierender Substrate. Die Positivkontrolle Staurosporin verursachte eine Erhöhung der Caspaseaktivität. Dabei zeigte der Caspase Glo® Assay, der im 96-*well* durchgeführt und mittels Plattenmessgerät ausgewertet wurde, ein deutlicheres Ergebnis für die Positivkontrolle als das auf Deckgläschen und am Mikroskop ausgewertete Image-iT Kit. Bei beiden Methoden zeigte sich jedoch keine Induktion der Apoptose für die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel in serumfreiem Medium.

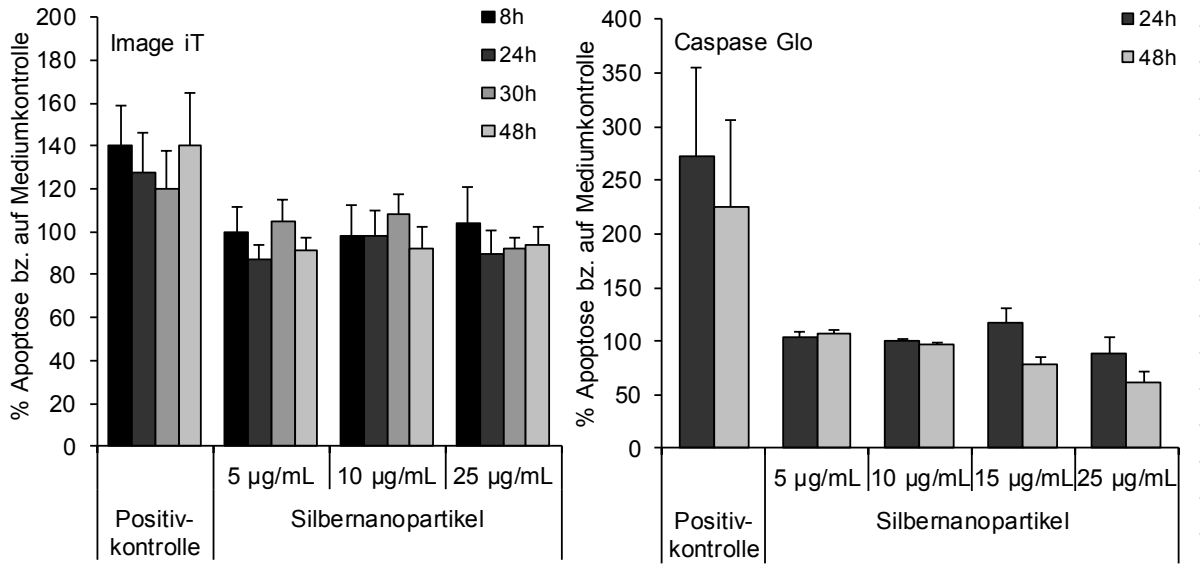

Abbildung 25: Detektion von Caspaseaktivität an differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln in serumfreiem Medium mittels Image-iT und Caspase Glo® Kit. Für den Versuch wurden 100 000 Caco-2 Zellen/*well* auf Deckgläschen in 12-*well* Platten oder 10 000 Caco-2 Zellen in 96-*well* Platten für 21 Tage differenziert und anschließend inkubiert. Als Positivkontrolle diente 2,5 µM Staurosporin. Die Werte sind auf die Mediumkontrolle normiert dargestellt. Die Versuche wurden mindestens 2-mal durchgeführt.

Neben der Messung der Caspaseaktivität wurde die Annexin V / 7AAD Färbung als weitere Möglichkeit der Detektion von Apoptose herangezogen. Da für die Messung am FACS einzelne in Suspension befindliche Zellen benötigt wurden, wurde diese Methode mit proliferierenden Caco-2 Zellen durchgeführt. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Messung alle 2 h zwischen 2 und 8, 16 und 30 sowie 40 und 48 h Inkubationszeit. Es ist zu erkennen, dass bei Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle Staurosporin im Vergleich zur Mediumkontrolle zu allen Zeitpunkten etwa 30 % der Zellen apoptotisch waren. Für die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel in serumfreiem Medium zeigte sich keine Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen, jedoch eine Zunahme des Anteils toter Zellen über die Zeit.

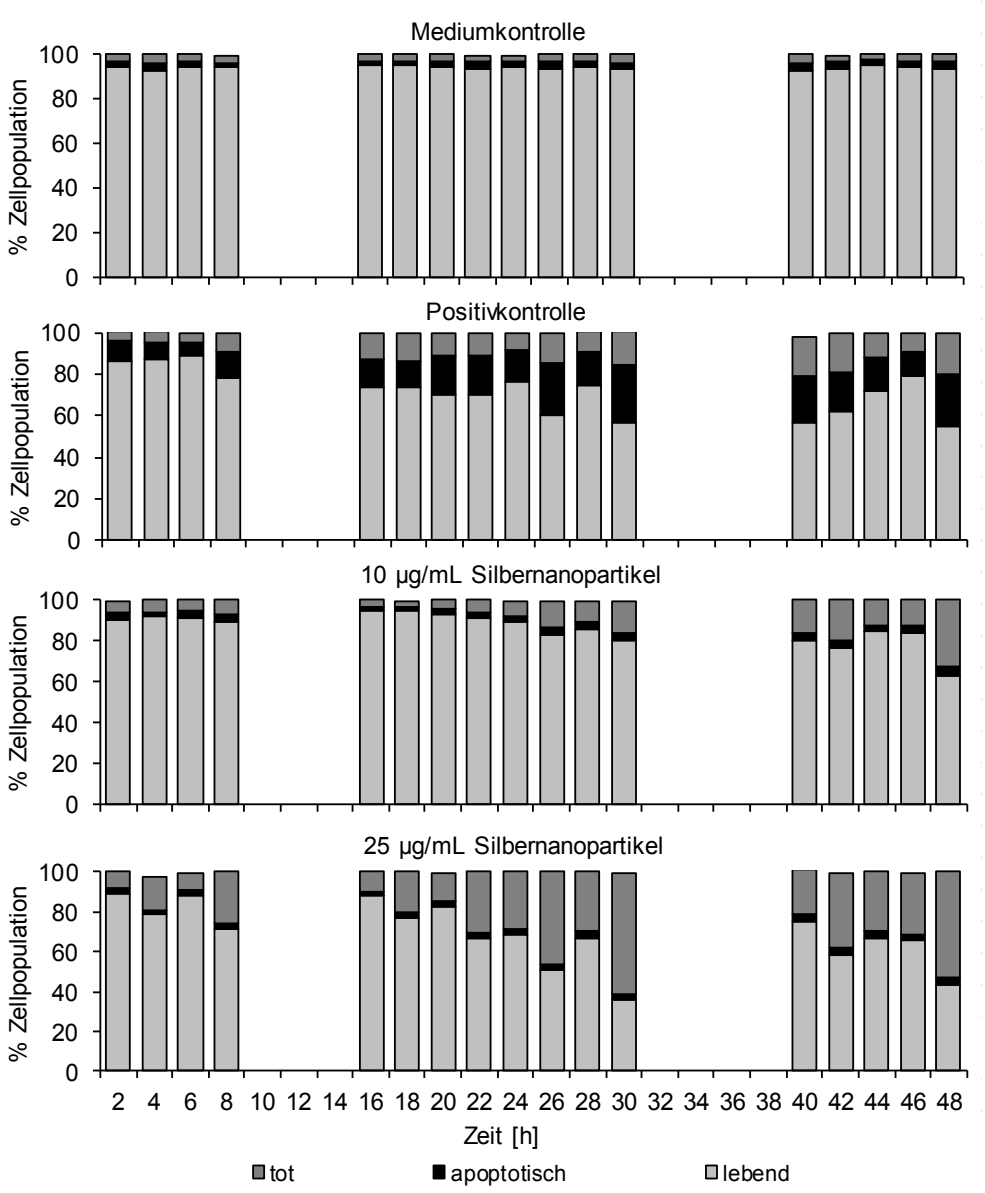

Abbildung 26: Annexin V / 7AAD Färbung an proliferierenden Caco-2 Zellen in serumfreiem Medium nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln. 100 000 Caco-2 Zellen*/well* wurden in 12-*well* Platten ausgesät, 24 h kultiviert und anschließend inkubiert. Als Positivkontrolle diente 10 µM Staurosporin. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin geerntet, mit Annexin V und 7AAD gefärbt und am FACS vermessen. Der Versuch wurde mindestens 2-mal wiederholt.

5.3.5 Induktion von oxidativem Stress in Caco-2 Zellen

Reaktive Sauerstoffspezies können direkt oder indirekt aufgrund der Einwirkung von exogenen Stoffen entstehen und diverse Stoffwechselwege ein- oder ausschalten [Thannickal und Fanburg, 2000]. So können sie unter anderem die Induktion von Apoptose unterdrücken [Chiarugi und Giannoni, 2008].

5.3.5.1 Dichlorofluorescein Assay

Für die Messung von oxidativem Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies wurde der Dichlorofluorescein Assay verwendet. Die Ergebnisse für differenzierte Caco-2 Zellen sind in Abbildung 27 dargestellt. Die als Positivkontrolle verwendeten Eisenionen in Form von $FeSO_4$ zeigten nach 24 h Inkubation einen deutlichen Anstieg. Die Beschichtung der Nanopartikel zeigte keine Auswirkungen auf den oxidativen Stress. Die Silberionen zeigten in beiden Medien einen leichten Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies ab etwa 5 µg/mL, obwohl sich bereits ab 2 µg/mL ein zytotoxischer Effekt in der Zellviabilitätsmessung zeigte. Für die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel war in serumfreiem Medium ein deutlicher Anstieg des oxidativen Stress Levels ab 3 µg/mL zu beobachten, während in serumhaltigem Medium die Messwerte im Vergleich zur Mediumkontrolle ab 15 µg/mL sanken. Dies war vermutlich auf den zytotoxischen Effekt der Nanopartikel zurückzuführen.

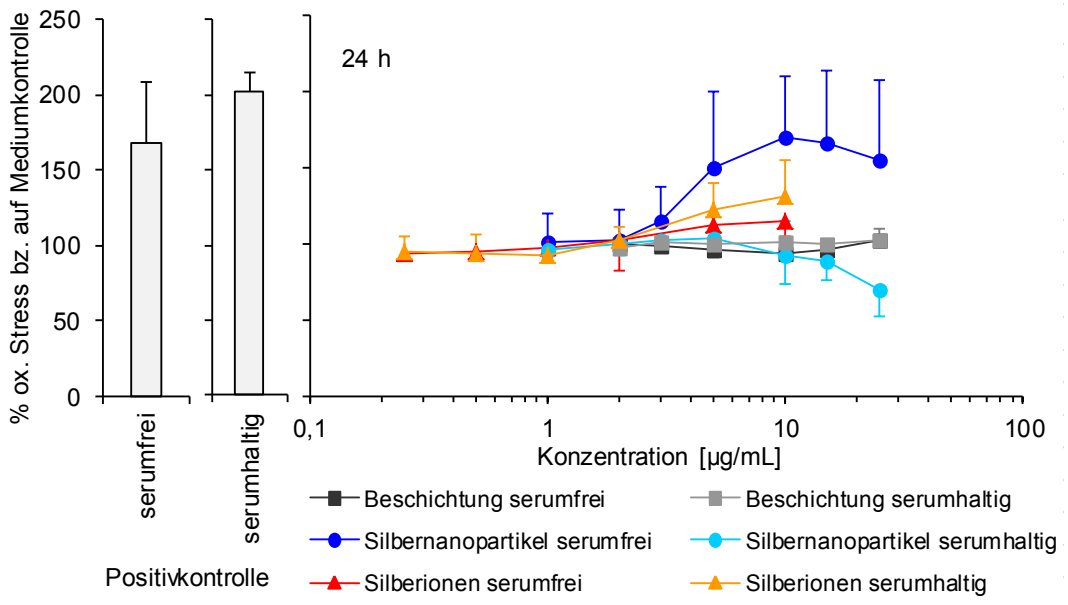

Abbildung 27: Messung des oxidativen Stresses an differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, der Beschichtung als Kontrolle, Silberionen sowie 100 µg/mL Eisen als $FeSO_4$ als Positivkontrolle. Für den Versuch wurden 10 000 Caco-2 Zellen/*well* ausgesät und innerhalb von 21 Tagen differenziert. Vor der Inkubation wurden die Zellen 1 h mit 2`,7`-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat beladen, anschließend mit PBS gewaschen und inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Werte sind auf die Mediumkontrolle normiert dargestellt. Der Versuch wurde mindestens 4-mal wiederholt.

5.3.5.1 Zytotoxizität nach Vorinkubation mit Antioxidantien

Als zusätzlichen Nachweis von oxidativem Stress wurden proliferierende Caco-2 Zellen 1 h mit den Antioxidantien *N*-Acetylcystein (NAC) und Vitamin C vorinkubiert, gewaschen und nach anschließender Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln wurde die Zellviabilität anhand des CTB Assays und der DAPI Färbung bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 dargestellt. Es zeigte sich eine leichte Reduktion der Zytotoxizität der Silbernanopartikel in serumfreiem Medium durch die Vorinkubation mit den beiden Antioxidantien.

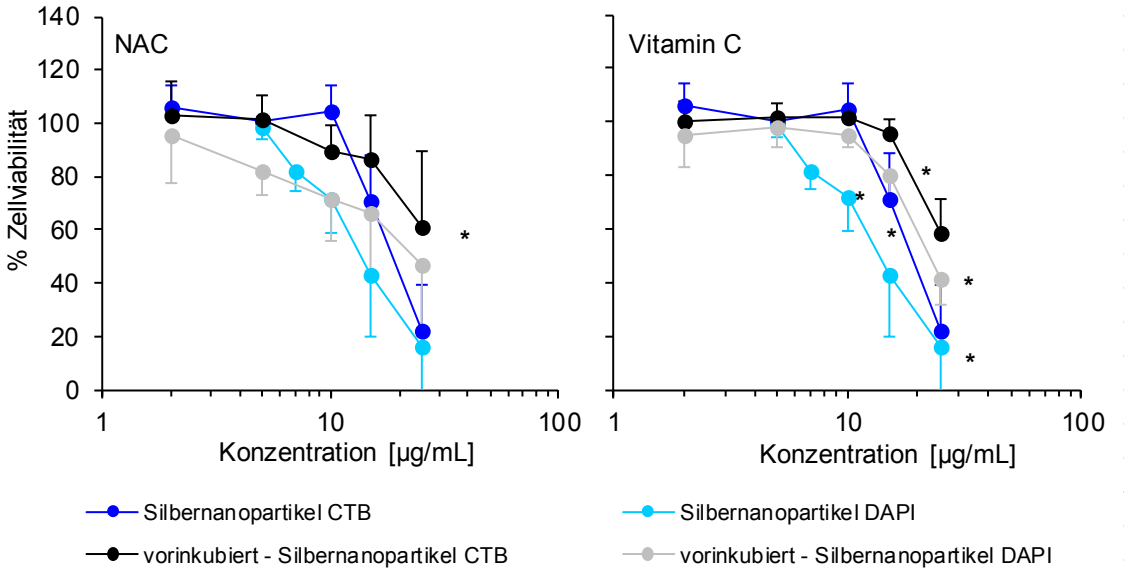

Abbildung 28: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumfreiem Medium nach 1 h Vorinkubation mit *N*-Acetylcystein (NAC) und Vitamin C und 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h in 96-*well* Platten kultiviert und nach Vorinkubation und Waschen in je 100 µL inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3-mal reproduziert. Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich statistisch signifikant von den nicht vorinkubierten Behandlungen (*Student`s* t-Test $p < 0,05$).

5.3.5.2 Glutathion Assay

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Ausmaßes an oxidativem Stress in den Zellen ist die Messung des Glutathionstatus. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Der gemessene Glutathiongesamtgehalt und der Gehalt an oxidiertem Glutathion sowie der daraus berechnete Teil an reduziertem Glutathion wurden jeweils auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Es war zu erkennen, dass die Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle Buthioninsulfoximin, die ein Glutathionsynthesehemmer ist, einen deutlichen Einfluss auf den Glutathionstatus hatte. Die Behandlung der Zellen mit Silberionen sowie mit Silbernanopartikeln führte bei den Zellen sowohl in serumfreiem als auch in serumhaltigem Medium zu einer Erhöhung des oxidierten Glutathiongehaltes.

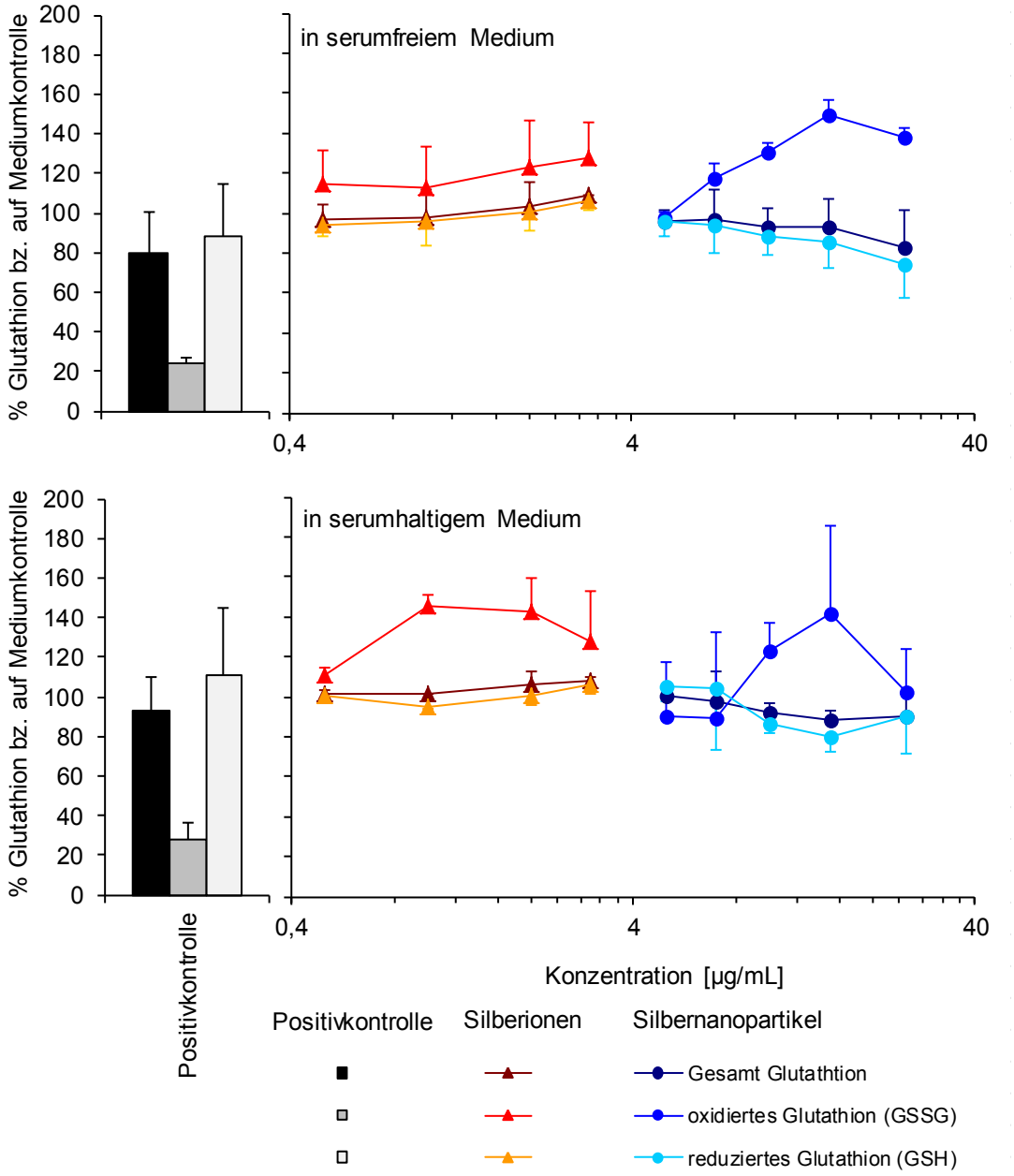

Abbildung 29: Messung des Glutathionstatus von differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silberionen. Für den Versuch wurden 10 000 Caco-2 Zellen/*well* ausgesät in 96-*well* Platten und innerhalb von 21 Tagen differenziert und anschließend inkubiert. Als Positivkontrolle diente 100 µM Buthioninsulfoximin. Nach 24 h Inkubation wurde der Glutathiongehalt mit dem GSH/GSSG Glo™ Kit bestimmt. Die Werte sind auf die Mediumkontrolle normiert dargestellt. Der Versuch wurde mindestens 2-mal wiederholt.

5.3.6 Induktion von Calciumeinstrom in Caco-2 Zellen

Da sich in der älteren Literatur Hinweise finden, dass Silberionen einen Einfluss auf den Calciumhaushalt und auf die damit verbundene Signaltransduktion nehmen können [Gould *et al.*, 1987], wurde anhand eines einfachen Fluoreszenzassays an den Caco-2 Zellen untersucht, ob die Inkubation mit Silber zum Einstrom von Calcium in das Zytoplasma führt.

Die Messung des Calciumeinstroms erfolgte mit Hilfe des Fluo-8 Kits der Firma AAT Bioquest. Die Ergebnisse für die Inkubation in serumfreiem Medium sind in Abbildung 30 dargestellt. Für die Inkubation in serumhaltigem Medium ergab sich ein vergleichbares Bild, das nicht dargestellt wurde. Es war sowohl auf proliferierenden als auch auf differenzierten Caco-2 Zellen eine Erhöhung der Fluoreszenz durch die Zugabe von Ethanol als Positivkontrolle zu erkennen. Eine Färbung der Zellen nach dem Assay mit Trypanblau und anschließender mikroskopischer Betrachtung legte nahe, dass dies aufgrund eines schnellen Zelltods durch die Permeabilisierung der Zellmembran geschah. Im Vergleich dazu zeigten die Silberionen und die Silbernanopartikel eine langsam ansteigende Fluoreszenz im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dies ließ sich innerhalb der ersten Stunde der Inkubation auch schon für Konzentrationen beobachten, die im CTB Assay nach 4 h noch keinen Einfluss auf die Zytotoxizität (vergleiche Abbildung 13, Seite 54 und Abbildung 14, Seite 55) zeigten. Es war ein Anstieg des Calciumeinstroms in Abhängigkeit von der Konzentration der Silberspezies zu beobachten, jedoch war dieser für die proliferierenden Caco-2 Zellen im Vergleich zu den differenzierten deutlicher und bereits für geringere Konzentrationen zu beobachten. Die Inkubation der Zellen mit den Beschichtungskontrollen der Silbernanopartikel führte nicht zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytoplasma der Zellen.

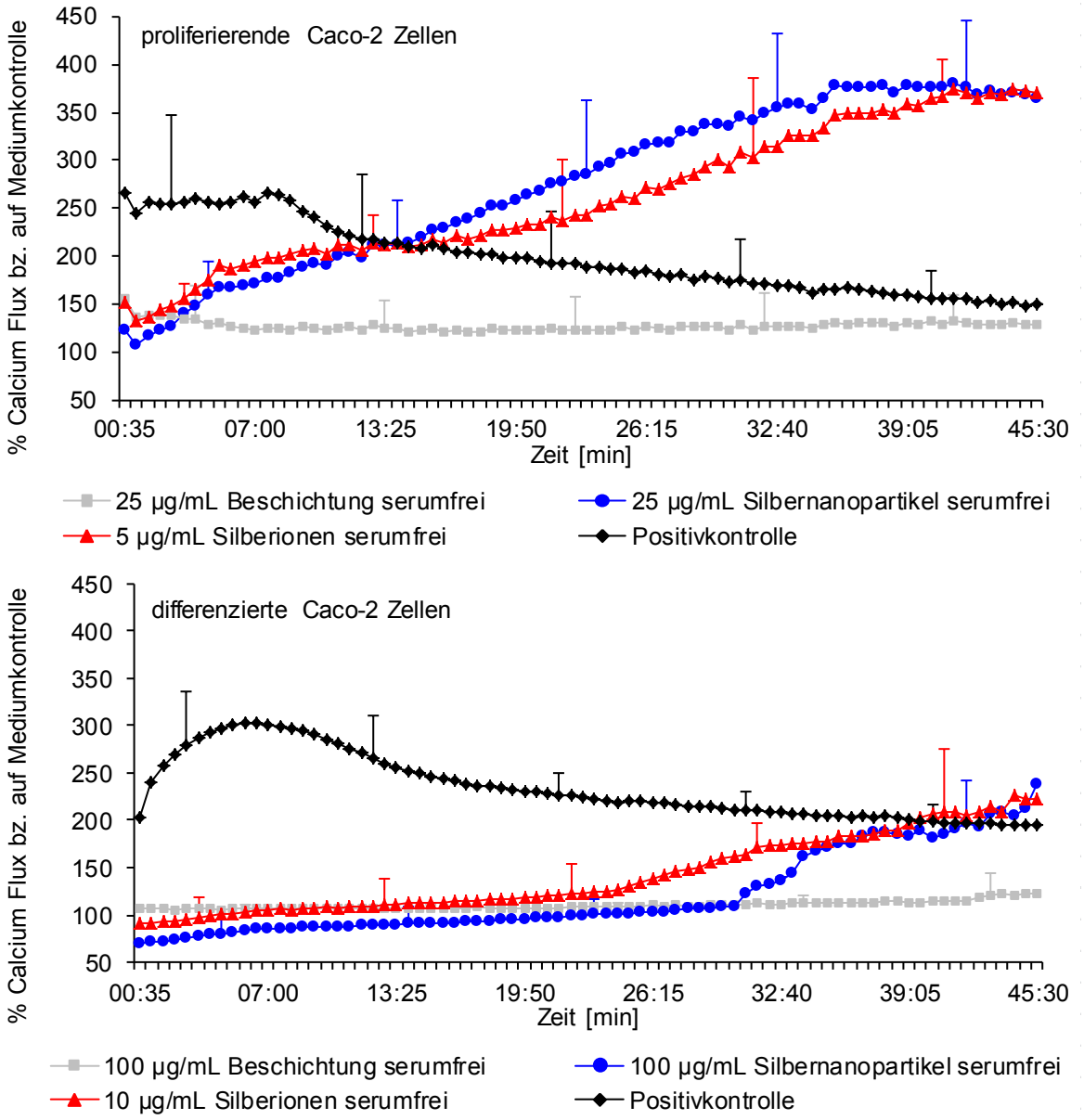

Abbildung 30: Messung des Calcium Fluxes in proliferierenden und differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Beschichtungskontrolle und Silberionen. Für den Versuch wurden 10 000 Caco-2 Zellen/*well* ausgesät und 24 h kultiviert oder innerhalb von 21 Tagen differenziert. Vor der Inkubation wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff des Fluo-8 Kits beladen. Als Positivkontrolle diente Ethanol. Der Versuch wurde mindestens 3-mal wiederholt.

5.3.7 Induktion von mechanischem Stress in Caco-2 Zellen

Bei der Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln war vor allem bei höheren Konzentrationen ein dunkler Niederschlag auf den Zellen zu beobachten. Da diese deutlich sichtbare Schicht auf den Zellen aus aggregierten und sedimentierten Nanopartikeln bestand, stellte sich die Frage, in wie weit diese mechanische Beanspruchung Ursache für die zytotoxische Wirkung der Silbernanopartikel war. Zur Klärung dieser Frage wurden proliferierende Caco-2 Zellen zum Vergleich in aufrechter Form und über Kopf mit Nanopartikeln und Silbernitrat inkubiert. Die

Inkubation, Detektion und Auswertung erfolgte mittels CTB Assay und DAPI Färbung. In den in Abbildung 31 dargestellten Ergebnissen war kein Unterschied in serumhaltigem Medium zu erkennen, während sich in serumfreiem Medium geringe Unterschiede zeigten.

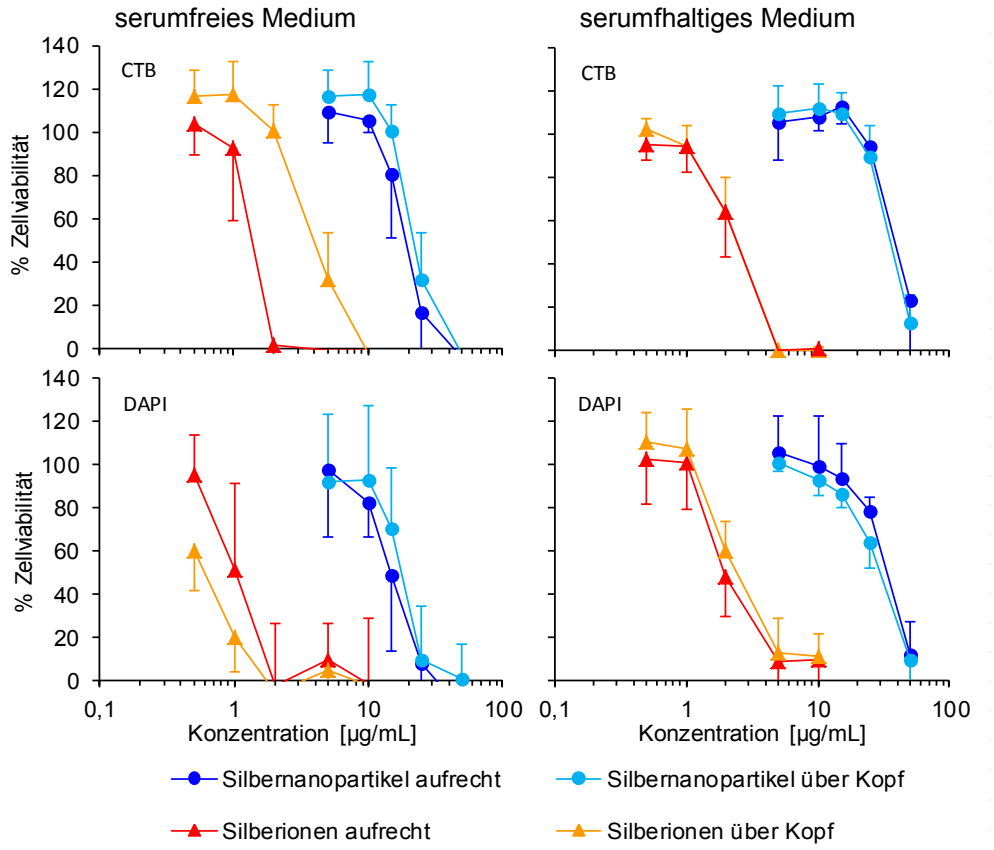

Abbildung 31: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium in aufrechter Position und über Kopf nach 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln und Silberionen. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h in 96-*well* Platten kultiviert und in je 400 µL abgedeckt mit Parafilm inkubiert. Die Messwerte sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3-mal reproduziert.

5.3.8 Induktion von mitochondrialer Depolarisation in Caco-2 Zellen

Oxidativer Stress und ein Einfluss auf die Calciumhomöostase können sowohl zu einer mitochondrialen Depolarisation führen als auch durch diese ausgelöst werden. Diese Ereignisse können dann zu Autophagie oder zum Zelltod in Form von Apoptose oder Nekrose führen [Lemasters *et al.*, 1998].

Die Ergebnisse der Messung der mitochondrialen Depolarisation mit Hilfe des JC-10 Kits sind in Abbildung 32 dargestellt. Für die Positivkontrolle Staurosporin war ein deutlicher Anstieg im Vergleich zur Mediumkontrolle zu erkennen, während die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel sowie die Silberionen nach 24 h Inkubation in serumfreiem und serumhaltigem Medium keine Depolarisation der Mitochondrien auslösten.

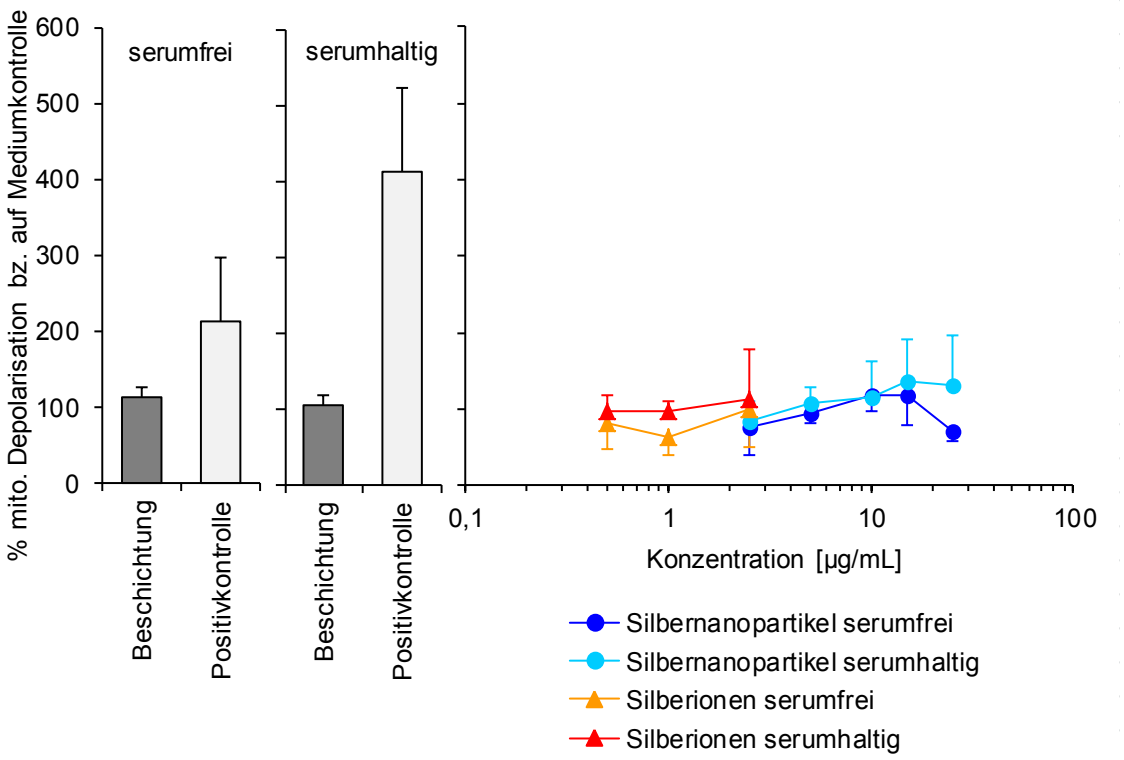

Abbildung 32: Messung der mitochondrialen Depolarisation an differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, der Beschichtung als Kontrolle, Silberionen sowie 2,5 µM Staurosporin als Positivkontrolle. Für den Versuch wurden 10 000 Caco-2 Zellen/*well* ausgesät und innerhalb von 21 Tagen differenziert. Nach der Inkubation wurde die Depolarisation der Mitochondrien mit dem JC-10 Assay gemessen. Die Werte sind auf die Mediumkontrolle normiert dargestellt. Der Versuch wurde mindestens 3-mal wiederholt.

5.3.9 Transkriptomanalyse der Caco-2 Zellen

Ergänzend zu den Einzeluntersuchungen verschiedener Zellparameter wurde eine Transkriptomanalyse mittels Micro-Array durchgeführt. Diese sollte weitere Anhaltspunkte und Hinweise zum Toxizitätsmechanismus der Silbernanopartikel in Intestinalzellen liefern. Ausgewertet wurden die umfangreichen Daten mit Hilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *Software*, die eine internetbasierte Interpretationshilfe für komplexe *omics*-Daten darstellt [ingenuity.com, 2013].

5.3.9.1 Micro-Array

Durch die Auswertung der Micro-Array Daten mit der IPA *Software* ergaben sich die in Tabelle 6 aufgeführten für die Betrachtung relevanten Anzahlen an differenziell regulierten Genen.

Tabelle 6: Anzahl der Gene, deren mRNA Expression im Vergleich zu Mediumkontrolle signifikant ($p < 0,05$) mindestens 1,4 fach reguliert war.

	Silbernanopartikel 2,5 µg/mL	Silbernanopartikel 25 µg/mL	Silbernitrat 0,5 µg/mL
hochreguliert	34 ↑	2134 ↑	15 ↑
runterreguliert	19 ↓	2918 ↓	100 ↓
gesamt	53	5052	115

Das in Abbildung 33 dargestellte Venn-Diagramm zeigt die Überlappung der differenziellen Genlisten. Es ist zu erkennen, dass der Großteil der durch die geringe Nanopartikelkonzentration regulierten Gene auch von der hohen Konzentration beeinflusst wurde. Im Vergleich dazu wurde etwa die Hälfte der durch Silberionen regulierten Gene auch durch die Nanopartikel beeinflusst. Die *Heatmap* in Abbildung 33 verdeutlicht, dass sich die Genexpression der Zellen, die mit 2,5 µg/mL Silbernanopartikel und 0,5 µg/mL Silbernitrat behandelt wurden, nur gering von der Mediumkontrolle unterschied, wohingegen die Behandlung der Zellen mit 25 µg/mL Silbernanopartikel zu sehr deutlichen Unterschieden in der Genexpression führte.

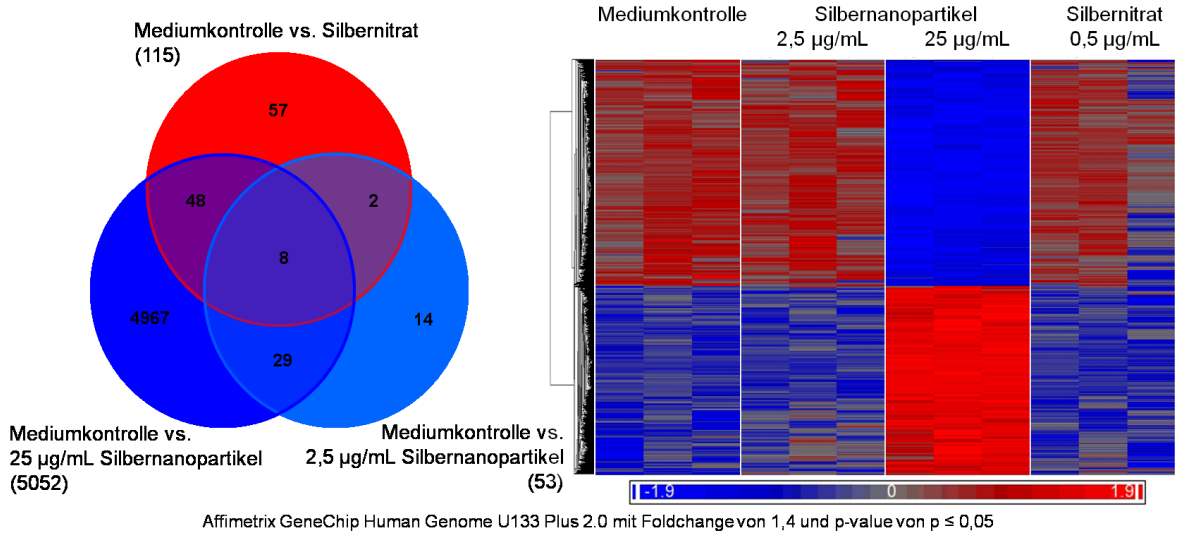

Abbildung 33: Venn-Diagramm und Heatmap der Gene der differenzierten Caco-2 Zellen, die 24 h mit 2,5 und 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und 0,5 µg/mL Silbernitrat in serumfreiem Medium inkubiert wurden, deren mRNA Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant ($p < 0,05$) mindestens 1,4 fach differenziell reguliert war.

Im Anhang befinden sich ausführliche Tabellen und ausgewählte Abbildungen zu den Netzwerken, den molekularen und zellulären Funktionen, den betroffenen Stoffwechselwegen, den am stärksten regulierten Genen und den vorgeschalteten Regulationsmechanismen. Inhaltlich ergaben sich aus der Analyse der Micro-Array Daten folgende Aussagen:

1) Es ließen sich anhand der veränderten Genexpression Anzeichen für oxidativen, mechanischen oder elektrophilen Stress erkennen. Dies zeigte sich in Stoffwechselwegen wie der

NRF2-vermittelten oxidativen Stressantwort (*NRF2-mediated Oxidative Stress Response*), an den am stärksten hochregulierten Genen wie diversen Metallothioneinen und Hitzeschockproteinen sowie der Hämoxygenase 1 (HMOX1) und der Aktivierung von vorgeschalteten Regulationsmechanismen wie den Transkriptionsfaktoren NRF2 (NFE2L2) und NFkB, die sich auch in einigen Netzwerken wiederfanden.

2) Die Ergebnisse deuteten auf einen Einfluss der Partikelinkubation auf das Zytoskelett sowie auf Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte hin. So zeigten sich zum Beispiel zahlreiche Expressionsänderungen bei Genen in den Stoffwechselwegen die über Integrine (*Integrin Signaling*), über Zell-Zell-Kontakte wie den *Adherens Junctions* (*Epithelial Adherens Junction Signaling*), *Tight Junctions* (*Tight Junction Signaling*) oder das Aktin-Zytoskelett (*Actin Cytosceleton Signaling*) verliefen. Weiterhin wurden vorgeschaltete Regulationsmechanismen wie Aktin und die Tyrosikinase der fokalen Adhäsionen (PTK2/FAK) induziert. Diese schienen mit Stoffwechselwegen wie den Kinase-Signalwegen Fokale Adhäsion Kinase (FAK), ERK, MAPK und ILK sowie dem P53 Signalweg und vorgeschalteten Regulatoren, wie p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38 MAPK), Proteinkinasen B (Akt), mitogenaktivierte Kinase (MAPK) und extrazellulär-signal regulierte Kinase (ERK1/2) in Verbindung zu stehen.

3) Es waren Hinweise auf eine Beeinflussung der Apoptose und der Nekrose sowie des Zellzyklus und der Proliferation zu finden. Dies zeigte sich in der Biofunktionskategorie Zelltod und -überleben oder Zellzyklus und dem Apoptose Stoffwechselweg. Auch einige Netzwerke standen mit Zelltod und –überleben oder Zellzyklus und Proliferation in Verbindung.

4) Weiterhin gab es Hinweise auf eine Störung der Caliumhomöostase oder einzelner calciumabhängiger Proteine, wie zum Beispiel der Stoffwechselweg Calcium Transport I. Unter den am stärksten regulierten Molekülen in den Ergebnissen der IPA Analyse für die mit 2,5 µg/mL Silbernanopartikeln inkubierten Caco-2 Zellen fanden sich das Enzym ATP2C2, das Calciumabhängig war. Weiterhin fanden sich Calciumionen in diversen Signalwegen.

5.3.9.2 PCR-Array

Zur Bestätigung der im Micro-Array identifizierten Änderungen der Genexpression nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silbernitrat wurden 89 Gene in einem PCR-Array betrachtet. Es wurden dieselben RNA-Proben analysiert, die auch in der Micro-Array Analyse verwendet wurden. Da sich, wie schon in den Ergebnissen der Micro-Array Analyse zu sehen war, für die geringe Konzentration an Nanopartikeln nur wenige regulierte Gene ergaben und die hohe Konzentration so gewählt war, dass sie in etwa einem EC_{20} entsprach, wurden zusätzlich zwei weitere Konzentrationen an Silbernanopartikeln gewählt (5 und 10 µg/mL). Die Ergebnisse aller Arrays sind als Übersicht in Tabelle A3 und

Tabelle A4, Seite XLIV zusammengefasst. Es zeigte sich, dass innerhalb desselben biologischen Replikats die PCR-Ergebnisse für 90 % der ausgewählten Gene hinsichtlich der Richtung der Regulation mit den Resultaten des Micro-Array übereinstimmten. Zwischen den PCR-Array Ergebnissen des ersten und des zweiten Replikats gab es ca. 95,5 % Übereinstimmung und zwischen den Micro-Array Daten und den PCR-Daten des zweiten Replikats 84 %, sodass sich insgesamt im Vergleich beider Arrays über alle Replikate eine Übereinstimmung von 80 % der Richtung der Expressionsänderung ergab.

Die betrachteten Gene wurden in die 6 Kategorien Stress und Entzündung, zelluläre Morphologie und Bewegung, Zelltod und Apoptose, Zellzyklus und Proliferation, Zell-Zell Kommunikation und zelluläre Signalwege und Calcium zugeordnet. In den folgenden Abbildung 37 bis Abbildung 34 sind die ersten 5 Kategorien anhand von Netzwerken dargestellt, die die Beziehungen der Gene untereinander veranschaulichen.

Die Gene der Gruppe Stress und Entzündung in Abbildung 34 zeigten mehrheitlich eine klare Reaktion auf einen Stressreiz an. So waren vor allem Chaperone hochreguliert (BAG3, CCT5, DNAJB6, HSPA1A und HSPA6), aber auch Gene die eine allgemeine Stressantwort anzeigen, wie der Transkriptionsfaktor ATF3, der Wachstumsfaktor BDNF sowie die durch oxidativen Stress regulierten Gene Peroxiredoxin (PRDX2), Sulfiredoxin (SRXN1), Hämoxygenase 1 (HMOX1) und Thioredoxinreduktase (TXNRD1). Die verringerte Expression von Albumin (ALB) zeigte, dass die Inkubation der Caco-2 Zellen mit Silbernanopartikeln Stress auslöst. Im Widerspruch dazu stand die Repression der Glutathion-S-transferasen GSTA1 und GSTA4, die jedoch sehr gering war. Auffallend waren zudem die Metallothioneine, die vor allem durch Metallionen induziert werden, da sie im ersten biologischen Replikat für die geringste Nanopartikelkonzentration leicht herunterreguliert waren, jedoch in den höheren Konzentrationen und im zweiten Replikat deutlich hoch reguliert wurden.

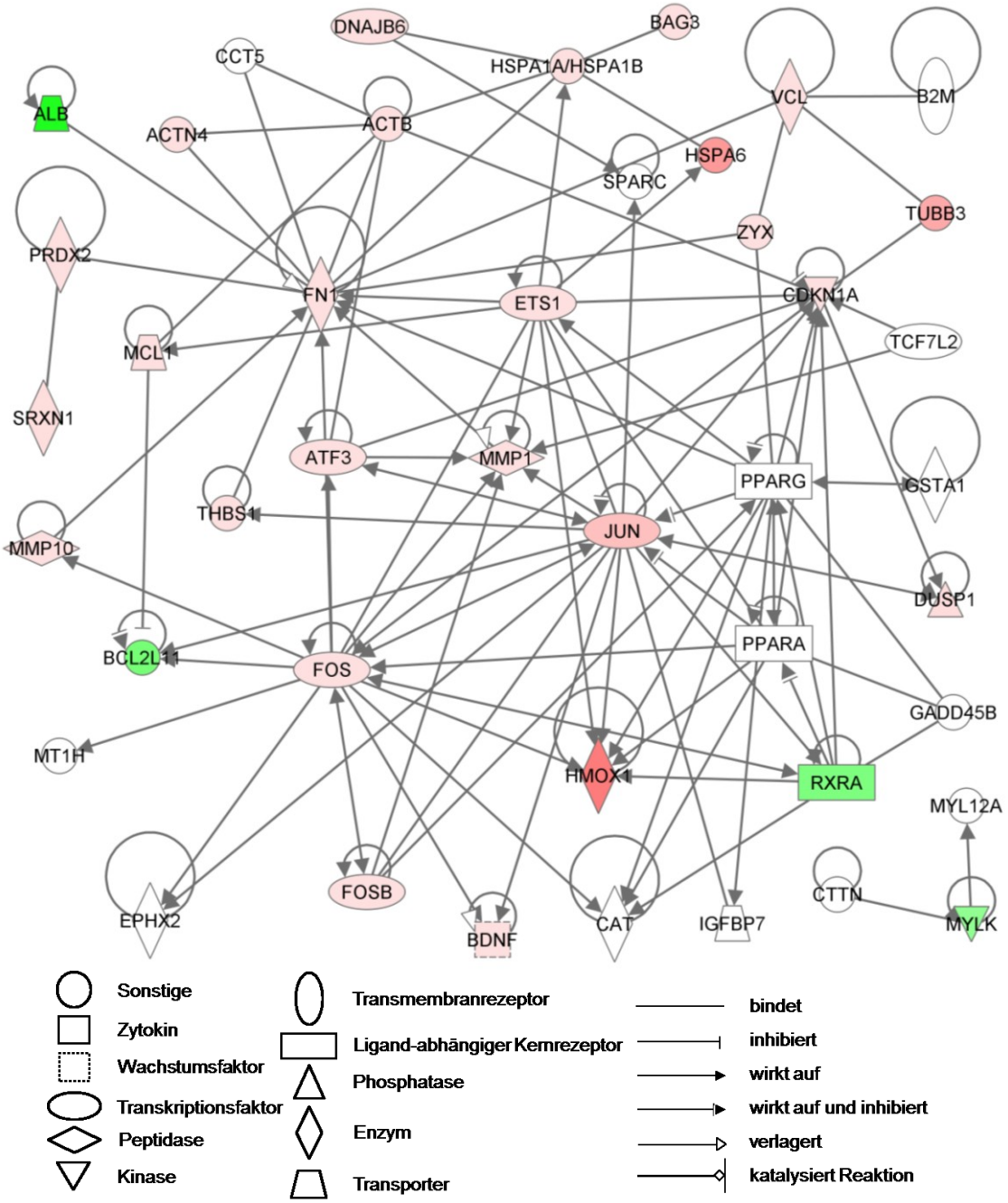

Abbildung 34: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Stress und Entzündung aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. Die Abbildung wurde mit der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *Software* erstellt.

In der Abbildung 35 ist das Netzwerk der Gene der Kategorie zelluläre Morphologie und Bewegung dargestellt. Darin zeigten sich unter anderem Gene, die für Zytoskelettproteine codieren reguliert. Dazu gehörten Zyxin (ZYX), Vinculin (VCL), die Aktinine ACTN2 und ACTN4, β-Aktin (ACTB) und Tubulin β3 (TUBB3) sowie Fibronektin (FN1) und Integrin (ITGA2), die für die extrazelluläre Matrix und den Kontakt zu dieser wichtig sind. Weiterhin fanden sich Metallopeptidasen, mit deren Hilfe die extrazelluläre Matrix beeinflusst werden kann.

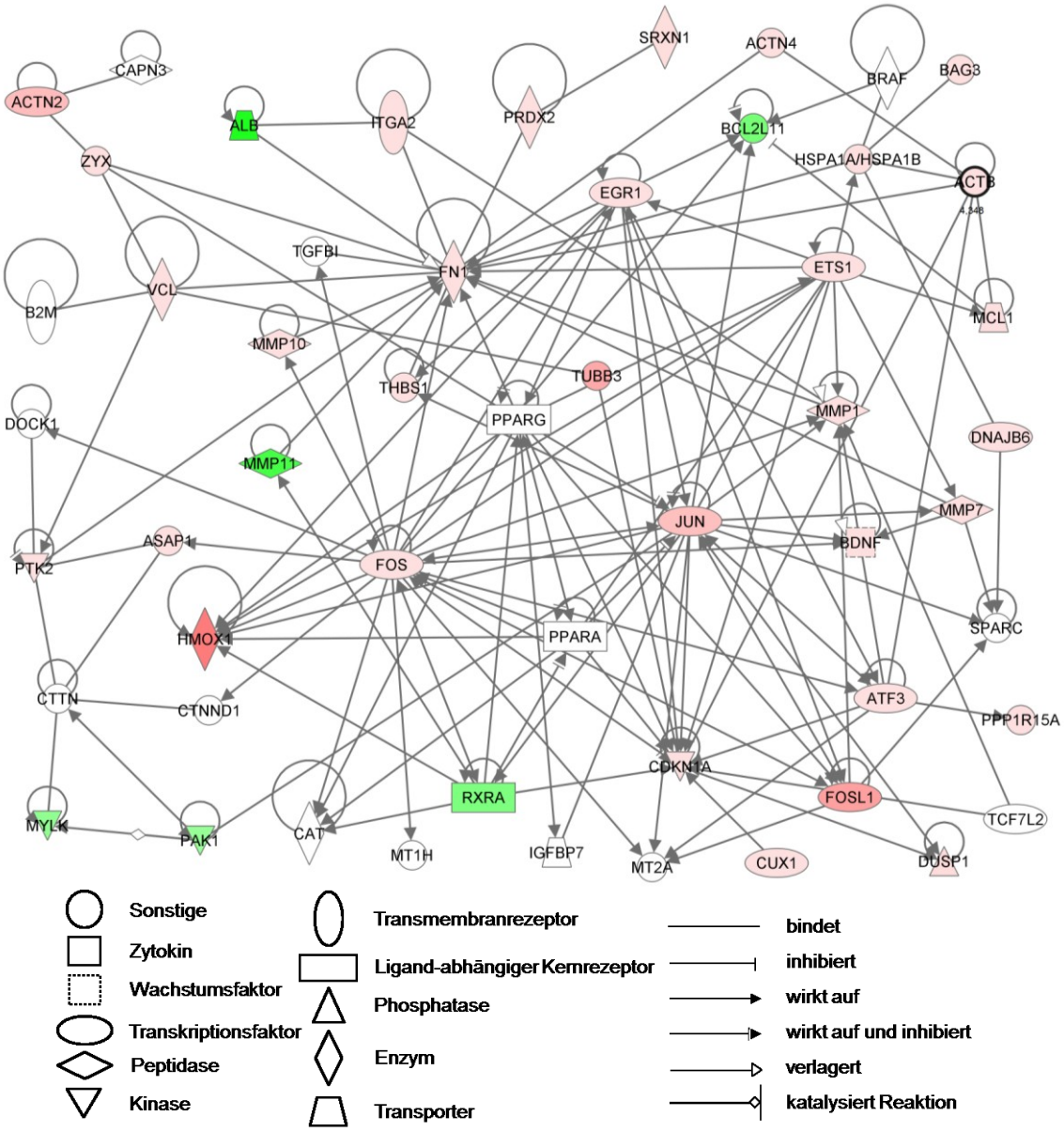

Abbildung 35: Netzwerk der Gene aus der Gruppe zelluläre Morphologie und Bewegung aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. Die Abbildung wurde mit der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *Software* erstellt.

Die Betrachtung der Gene aus den Kategorien Zelltod und Apoptose in Abbildung 36 sprach für eine Abschwächung der Apoptose. So waren zum Beispiel die pro-apoptotischen Gene BCL2L11 und die Proteinkinase PAK1 herunterreguliert und die anti-apoptotischen Gene für den Chaperonregulator BAG3, das Chaperon DNAJB6 und Protein MCL1 über alle Konzentrationen, Replikate und Analysen hochreguliert. In diese Kategorie fielen noch viele weitere Gene, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf das Überleben der Zelle haben.

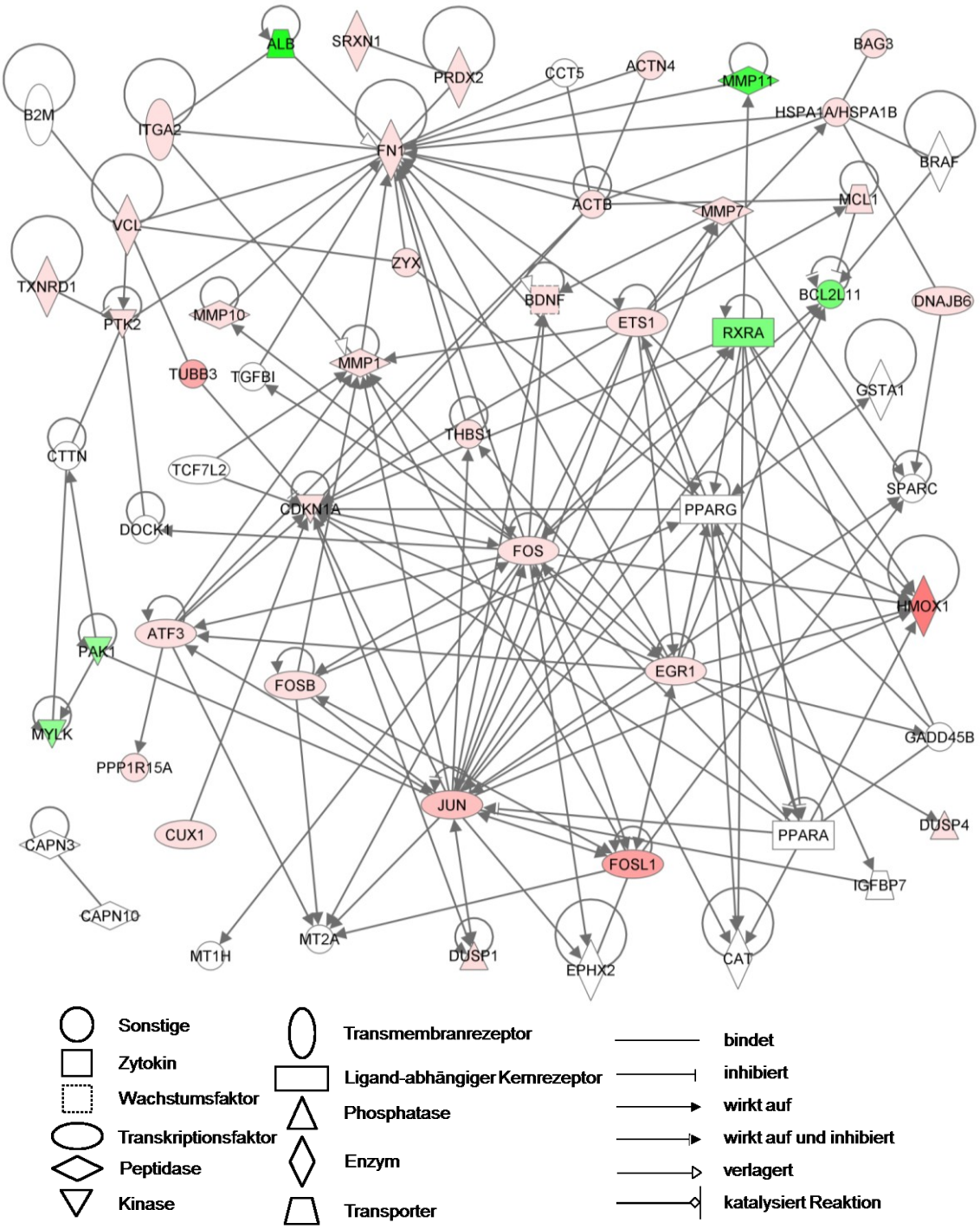

Abbildung 36: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Zelltod und Apoptose aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. Die Abbildung wurde mit der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *Software* erstellt.

Die vierte Kategorie Zellzyklus und Proliferation in Abbildung 37 enthielt neben anderen Genen vor allem Transkriptionsfaktoren (EGR1, DNAJB6, EST1, EGR1, JUN, FOS, CUX1, ATF3, FOSL1 und FOSB), die neben anderen Vorgängen auch den Zellzyklus, die Proliferation und das Zellwachstum steuern.

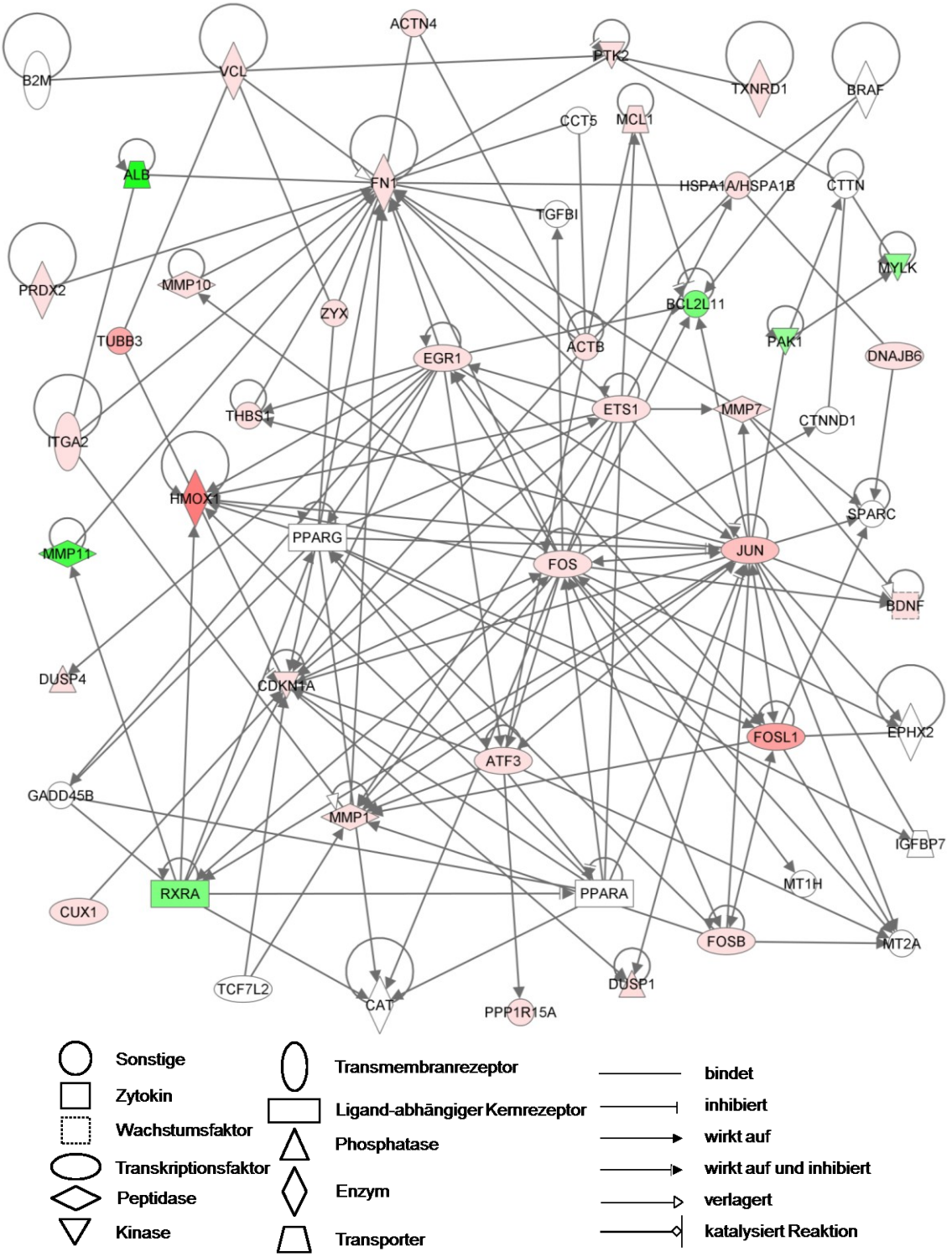

Abbildung 37: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Zellzyklus und Proliferation aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. Die Abbildung wurde mit der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *Software* erstellt.

In der Kategorie Zell-Zell Kommunikation und zelluläre Signalwege in Abbildung 38 waren vor allem wieder Gene zu finden, die direkt Bestandteil des Zellskeletts oder der extrazellulären Matrix sind, wie β-Aktin (ACTB), Aktinin (ACTN2), Fibronektin (FN1), Integrin (ITGA2), Vinculin (VCL) und Zyxin (ZYX), oder diese beeinflussen, wie Matrixmetallopeptidasen (MMP1

und MMP7). Mit diesen in Zusammenhang standen Gene, die in verschiedene Signalwege eingebunden waren, wie das GTPase-aktivierende Protein ASAP1, die Transkriptionsfaktoren FOS, FOSB und FOSL1 sowie die Kinasen PTK2 und PAK1.

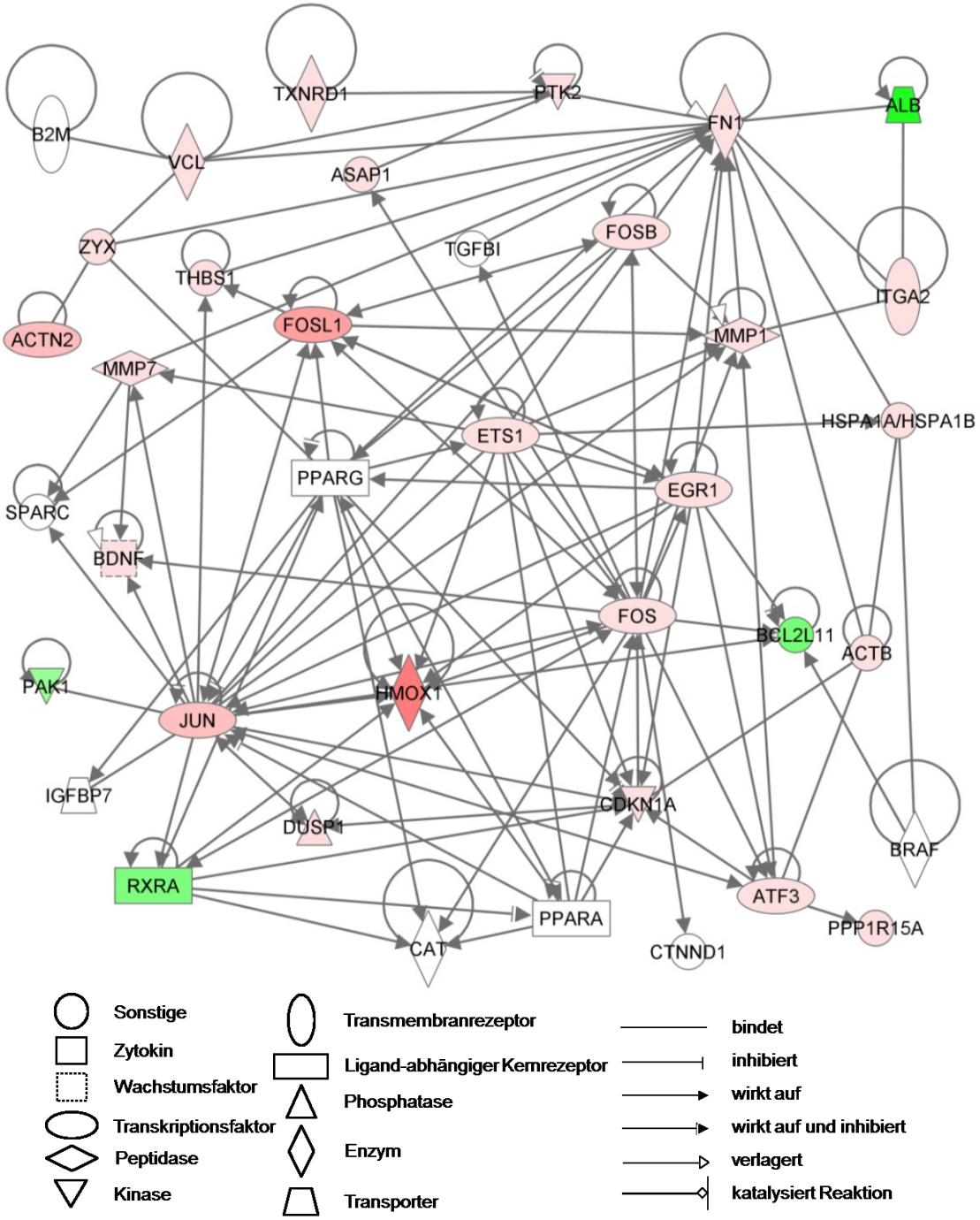

Abbildung 38: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Zell-Zell Kommunikation und zelluläre Signalwege aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. Die Abbildung wurde mit der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *Software* erstellt.

6 Diskussion

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Aufnahme und Toxizität von Silbernanopartikeln im intestinalen Epithel leisten, um eine Beurteilung und Risikobewertung von Nanopartikeln zu ermöglichen, da synthetische Nanopartikel zunehmend auch im Lebensmittelsektor eingesetzt werden. Dafür werden in diesem Kapitel die erarbeiteten Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschungen eingeordnet und interpretiert. Dieses Kapitel ist in folgende Abschnitte untergliedert:

- Aufnahme von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen
- Einflussfaktoren auf die Zytotoxizität von Silbernanopartikeln
- Wirkungsmechanismus von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen

In der folgenden Diskussion wird vornehmlich Literatur zitiert, die sich mit Silbernanopartikeln befasst. Da Nanopartikel neben der Konzentration und dem Material sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können, ist eine ausreichende Kenntnis dieser wichtig für die Interpretation der damit erarbeiteten Ergebnisse. Obwohl die Literatur zu Silbernanopartikeln bereits sehr umfassend ist, sind Vergleiche der gewonnenen Erkenntnisse aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften immer mit Vorsicht zu betrachten. Zudem sind in früheren Werken die verwendeten Partikel oft unzureichend charakterisiert. Da es in der folgenden Diskussion zugunsten des Leseflusses nicht möglich ist, die wichtigsten Eigenschaften der Silbernanopartikel der zitierten Literatur zu nennen, sind die Größe, Beschichtung und Ionenfreisetzung in Tabelle A1 und Tabelle A2 im Anhang Seite XXXIX und XLII zu finden.

6.1 Aufnahme von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen

Zunächst soll die Frage nach der Aufnahme von Silbernanopartikeln betrachtet werden. Zu dieser Fragestellung haben verschiedene Tierstudien gezeigt, dass nach oraler Gabe von Silbernanopartikeln Silber in allen betrachteten Organen zu finden ist [Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010b]. Für die Untersuchung des genauen Aufnahmemechanismus bieten sich *in vitro* Modelle an. Das wichtigste zelluläre Modell der humanen Darmbarriere ist das Caco-2 Modell. Die hier durchgeführten Untersuchungen am Caco-2 Zellmodell in der Transwell®-Technik ergaben, dass nach apikaler Inkubation des intakten Zellmonolayers mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silberionen in nicht zytotoxischen Konzentrationen im basolateralen Medium nahezu kein Silber (weniger als 1 und 2 % des Silbers der Silbernanopartikel und 10 % des Silbers des Silbernitrats) nachweisbar ist. Gleiches zeigt sich im M-Zell Modell und der Caco-2/HT-29/B6 Cokultur. Vergleichbare Ergebnisse zeigen Bouwmeester *et al.* mit einem Durchtritt von nur etwa 0,5 % Silber nach Inkubation mit Silbernanopartikeln unbekannter

Beschichtung und Silbernitrat im M-Zell Modell [Bouwmeester *et al.*, 2011]. Eine neuere Rattenstudie zeigt zudem eine sehr geringe Bioverfügbarkeit von Silber von nur 1,2 bis 4,2 % über 96 h mit 1 bis 10 mg/kg Silbernanopartikel, deren Ionenfreisetzung nicht bekannt ist [Park *et al.*, 2011]. In weiteren Studien wird die Bioverfügbarkeit nicht bestimmt, sodass unklar ist, ob das Silber im gastrointestinalen Trakt verbleibt oder aufgenommen und über die Galle wieder in die Fäzes abgegeben wird, wie intravenöse Gaben zeigen [Lee *et al.*, 2012]. Die Studien belegen trotzdem, dass sich der Großteil des verabreichten Silbers (49 ± 21 % des Silberacetats und 63 ± 23 % Silber der Silbernanopartikel) in den Fäzes der 28 Tage lang gefütterten Ratten befindet [Loeschner *et al.*, 2011]. Auch von den hier verwendeten Tensid-beschichteten Silbernanopartikel werden nach 28 Tage 99 % der oral verabreichten Nanopartikel in den Fäzes der Ratten gefunden [von der Zande *et al.*, 2012]. Die Enterozyten bilden somit eine Barriere für Tensid-beschichtete Silbernanopartikel und Silberionen in nicht zytotoxischen Konzentrationen.

Neben den hohen Gehalten an Silber in den Fäzes wird in den Studien ein deutlicher Gehalt an Silber im Darmgewebe gefunden, was sich teilweise in einer optisch erkennbaren Schwarzfärbung äußert [Kim *et al.*, 2010b; Loeschner *et al.*, 2011; von der Zande *et al.*, 2012]. Diese Beobachtungen legen eine Aufnahme des Silbers in die Zellen nahe. Hier durchgeführte elektronenmikroskopische Betrachtungen der Nanopartikelaufnahme auf zellulärer Ebene zeigen, dass die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel durch Caco-2 Zellen nicht in größerer Zahl aufgenommen werden (siehe Abschnitt 5.1.2, Seite 50). Ansammlungen von Nanopartikeln finden sich jedoch auf den Zelloberflächen in Kontakt mit den Mikrovilli. Weiterführende Untersuchungen mit Tannin- und PVP-beschichteten Silbernanopartikeln zeigen eine etwas höhere Aufnahme in die Zellen, jedoch befinden sich auch hier die Partikel nicht in intrazellulären Vesikeln [unveröffentlichte Ergebnisse von Dajana Lichtenstein]. Gaiser *et al.* können ebenfalls anhand konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nur vereinzelte Silbernanopartikel und Silbermikropartikel nach 24 h Inkubation von Caco-2 Zellen zeigen [Gaiser *et al.*, 2012]. Die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel finden sich wiederum in der humanen Hepatozytenzelllinie C3A in einer größeren Anzahl frei im Zytoplasma [Gaiser *et al.*, 2013; Kermanizadeh *et al.*, 2012a]. Diese zelltypspezifische Aufnahme von Silbernanopartikeln wird auch in humanen Blutzellen beobachtet [Greulich *et al.*, 2011]. Weiterhin kann für Eisenoxidnanopartikel eine Abhängigkeit der Aufnahmemechanismen in Caco-2 Zellen von der Größe sowie von der Beschichtung gezeigt werden [Jahn *et al.*, 2012]. Für den Durchtritt durch den Caco-2 Monolayer wird ebenfalls eine Abhängigkeit von der Beschichtung von Goldnanopartikeln beobachtet [Lin *et al.*, 2012a]. Die Aufnahme der Nanopartikel ist somit abhängig von der Größe und der Beschichtung, aber auch vom betrachteten Zelltyp. Der Anteil an Nanopartikeln der von den Intestinalzellen aufgenommen und nicht in das Körperinnere gelangt, wird alle 3 bis 6 Tage mit diesen abgeschilfert und geht in die Fäzes ein [Rehner und Daniel, 2010].

Für die in den Tierversuchen in den Organen, wie unter anderem in Leber, Niere, Lunge, Muskeln und Gehirn gefundenen Silbernanopartikel sind nach den *in vitro* Beobachtungen zwei Aufnahmemöglichkeiten denkbar:

1) Die Aufnahme von geringen Mengen könnte sich über die gesamte innere Fläche des Dünndarms summieren und zu einer Absorptionsrate führen, die im Bereich von einigen Prozent liegt. Dazu ist anzumerken, dass der Caco-2 Monolayer dichter als das humane Epithel ist und somit die parazelluläre Aufnahme *in vivo* wahrscheinlich höher ist als *in vitro* [Artursson und Karlsson, 1991]. Zande *et al.* stellen zudem eine Korrelation zwischen Silberaufnahme und der Menge der von den Nanopartikeln freigesetzten Ionen fest [von der Zande *et al.*, 2012]. Im Zusammenhang mit dem Fund von Nanopartikeln in den Geweben nach der Gabe von ionischem Silber wird geschlussfolgert, dass vor allem die Silberionen aufgenommen werden. Die Aufnahme von Silberionen kann unter anderem von dem für die Aufnahme von essenziellen Kupfer-(I)-ionen verantwortlichen Transporter CTR1, aufgrund der Ähnlichkeit der Silberionen mit Kupfer-(I)-ionen, stattfinden [Gupta und Lutsenko, 2009]. Dabei ist zu bedenken, dass der pH-Wert einen Einfluss auf die Ionenfreisetzung hat [von der Zande *et al.*, 2012]. Der Mucus, der von den Gobletzellen produziert wird, hilft, den pH Wert über dem Intestinalepithel aufrecht zu halten [Elder *et al.*, 2009]. Dieser liegt bei Meerschweinchen und Ratten fast unabhängig vom Darminhalt bei ca. 7 [Rechkemmer *et al.*, 1986]. Auch an den Spitzen der Villis der Enterozyten befinden sich negativ geladene Kohlenhydratseitenketten von Glycoproteinen, die einen durchgehenden, filamentösen Schutzfilm formen und einen niedrigen pH Wert im unmittelbaren Zellumfeld im Vergleich zum Dünndarmlumen halten. [Elder *et al.*, 2009] Dies könnte direkt an den Zellen zu einer höheren Silberionenfreisetzung beitragen als anhand des luminalen pH-Wertes des Darms zu vermuten ist. Dies würde die Beobachtung erklären, dass mehr Silber in der Caco-2/HT-29/B6 Cokultur gefunden wird als in der Caco-2 Monokultur.

2) Die Partikel gelangen durch Persorption, das heißt durch apoptotische oder nekrotische Lücken im Darmepithel, in das Körperinnere. Dieser Aufnahmeweg konnte mithilfe des Caco-2 Modells im Transwell®-System und den verwendeten nicht zytotoxischen Konzentrationen an Nanopartikeln in dieser Arbeit nicht abgebildet werden. Klare Hinweise auf diesen Aufnahmeweg liefern Tierversuche mit Goldnanopartikeln [Hillyer und Albrecht, 2001]. Die im Vergleich zu den *in vitro* Untersuchungen verwendeten deutlich höheren Konzentrationen *in vivo*, könnten sogar eine erhöhte Anzahl an toten Zellen im Dünndarm bedingen. Obwohl ein direkter Vergleich des statischen Inkubationssystems, wie es zur Untersuchung im Rahmen von *in vitro* Versuchen meist verwendet wird, mit der dynamischen Situation *in vivo* nur schwer möglich ist, kann die Messung der Zytotoxizität jedoch einen Anhaltspunkt geben, welche Konzentrationen vermutlich einen akut zytotoxischen Effekt nach oraler Aufnahme im Dünndarm zeigen könnten. So ist es denkbar, dass die den Tieren verabreichten hohen Gehalte von 30 bis 1000 mg/kg Körpergewicht [Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009b; Kim *et al.*, 2010b; Loeschner *et*

al., 2011; von der Zande *et al.*, 2012] durchaus zytotoxische Effekte auf die Intestinalzellen haben können und über entstehende Lücken im Epithel eine vermehrte Aufnahme der Nanopartikel stattfindet. Im Vergleich zu den *in vitro* und *in vivo* Experimenten setzen sich human relevante Dosen aus mehreren Teilen zusammen. Der Gesamtgehalt wurde in Blut mit 0,1 bis 0,2 µg/L gemessen [Armitage *et al.*, 1996]. Die Grundbelastung durch die Aufnahme mit der Nahrung wird auf 70 bis 90 µg/Tag geschätzt [Wijnhoven *et al.*, 2009]. Ein weiterer Anteil kommt aus Bedarfsgegenständen, die Silber enthalten dürfen, aus denen jedoch nicht mehr als 0,05 mg/kg in Lebensmittel freigesetzt werden darf [BfR, 2010]. Die zunehmende Vermarktung von Silber beschichten Produkten, die als antibakteriell ausgelobt werden, führt gegenwärtig zu einer steigenden Exposition des Menschen. Weiterhin sind Nahrungsergänzungsmittel oder Arzneimittel mit kolloidalem Silber auf dem Markt, deren Aufnahmeempfehlung je nach Produkt stark schwanken kann. Der Hersteller des in dieser Arbeit mit untersuchten Nahrungsergänzungsmittels empfiehlt zum Beispiel, dass Erwachsene täglich einen halben Teelöffel (2,5 mL) kolloidales Silber morgens nüchtern mit Wasser zu sich nehmen sollten. Laut Hersteller enthält das Produkt 500 ppm Silber [fairvital.com, 2013]. Wird die gewünschte Menge mit einem Glas Wasser, das 200 mL enthält, zu sich genommen, so beträgt die Konzentration an Silber im Wasserglas 6,25 µg/mL. Dies wird im Verdauungstrakt durch Magensaft, Galle und Darmsäfte weiter verdünnt, bevor es auf die Intestinalzellen und Mikrobiota des Darms trifft. Wird somit weiterhin eine Verdünnung durch Verdauungsflüssigkeiten um 1 L angenommen, so entsteht eine Konzentration von etwa 1 µg/mL. Die Transitzeit von Lebensmitteln durch den Dünndarm liegt bei etwa 3 bis 8 h [Fadda *et al.*, 2009]. Bei dieser Konzentration und Inkubationszeit ist weder das Nahrungsergänzungsmittel noch einer der anderen getesteten Silbernanopartikel akut zytotoxisch. Nebenbei bemerkt rät der Hersteller zur gleichzeitigen Einnahme probiotischer Bakterien, was, vor dem Hintergrund der viel beworbenen antibakteriellen Wirkung von Silberverbindungen, sehr widersinnig erscheint.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Tensid-beschichtete Silbernanopartikel das gastrointestinale Epithel nicht in größerer Menge überwinden oder von den Epithelzellen aufgenommen werden.

6.2 Einflussfaktoren auf die Zytotoxizität von Silbernanopartikeln

Wie im vorhergehenden Abschnitt erörtert, zeigt sich, dass die Aufnahme von Silbernanopartikeln unter anderem von der Art der Zelle und der Beschichtung der Nanopartikel abhängt. Ausgehend davon soll in diesem zweiten Abschnitt betrachtet werden welche Faktoren die Zytotoxizität von Silbernanopartikeln beeinflussen. In der Literatur ist wenig umstritten, dass die Größe der Nanopartikel einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat [Carlson *et al.*, 2008; Cha *et*

al., 2008; Liu *et al.*, 2010b]. Im Folgenden sollen als weitere Faktoren der Einfluss der Zelllinie, des Inkubationsmediums und der Beschichtung der Silbernanopartikel diskutiert werden.

Eine unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Zelllinien gegenüber Stressoren ist bekannt und auch hier für Silbernanopartikel zu beobachten. Beim Vergleich verschiedener Zelllinien sollte jedoch auf verschiedene Einflussfaktoren geachtet werden, die das Ergebnis verfälschen können. Dies ist nicht nur beim Vergleich von Zytotoxizitätsdaten aus verschiedenen Quellen der Fall. Die Reihenfolge der Empfindlichkeit der Zellen hängt jedoch zudem von der Konzentrationsangabe der Nanopartikel ab. Eine Umrechnung von Masse/Volumen in Masse/Wachstumsfläche oder Masse/Zelle verschiebt dieses Bild und es zeigt sich eine andere Reihenfolge (siehe Abschnitt 5.2.3, Seite 57). Grund dafür ist, dass in die Umrechnung das Inkubationsvolumen, die Wachstumsfläche im *well* oder die geschätzte Zellzahl zum Zeitpunkt der Inkubation eingeht. Bei weiteren Experimenten zeigt sich, dass das Inkubationsvolumen für stabile Nanopartikelsuspensionen auch bei gleichen restlichen Parametern bereits einen Einfluss auf die Messung der Zytotoxizität hat (siehe Abschnitt 5.2.2, Seite 56). Dies wird bei der Angabe der Konzentration meist gar nicht mit einbezogen und in manchen Veröffentlichungen nicht mit angegeben. Derartige Einflüsse der Rahmenbedingungen sollten bei Vergleichen von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen bedacht werden.

Neben dem Einfluss der Zelllinie auf die Zytotoxizität hat die Zusammensetzung des Inkubationsmediums, vor allem des Gehalts an fötalem Kälberserum (FCS), einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität der Nanopartikelsuspension. Die zugesetzten 10 % FCS stabilisieren die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel, während sie in serumfreiem Medium mit 1 % Insulin/Transferrin/Selen ausfallen und sedimentieren. Eine Stabilisierung von Nanopartikelsuspensionen durch die Zugabe von Serum zum Zellkulturmedium kann auch in anderen Arbeiten mit Silbernanopartikeln beobachtet werden [Foldbjerg *et al.*, 2009]. Zudem liegt nahe, dass sich die Proteinkorona der Partikel unterscheidet, da in serumhaltigem Medium diverse Proteine auf den Partikeln zu finden sind (siehe Abschnitt 4.1 Seite 24), wohingegen in serumfreiem Medium nur Transferrin und Insulin an die Partikel adsorbieren können. In anderen Arbeiten zeigt sich, dass auch die weiteren Bestandteile des Mediums (Vergleich DMEM und RPMI) einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Proteinkorona von Goldnanopartikeln haben [Maiorano *et al.*, 2010]. Kittler *et al.* zeigen, dass der Zusatz von FCS oder BSA einen protektiven Effekt für die humane Mesenchymalzelllinie hMSCs in Bezug auf die Toxizität von Silbernanopartikeln haben [Kittler *et al.*, 2010b]. Für die hier untersuchten Tensid-beschichteten Silbernanopartikel zeigen sich geringe Unterschiede auf proliferierenden Caco-2 Zellen in serumhaltigem und serumfreiem Zellkulturmedium, die in den weniger empfindlichen differenzierten Caco-2 Zellen nicht mehr zu beobachten sind (siehe Abschnitt 5.2.1, Seite 53). Auch die Analyse der Genexpression mittels quantitative *real time* RT-PCR erbringt keine systematischen Unterschiede zwischen der Wirkung der Tensid-beschichteten Silbernanopartikel

in serumfreiem und serumhaltigem Medium (siehe Abschnitt 5.3.1.2 Seite 64). Ein deutlicher Unterschied ist jedoch im Vergleich von aufrecht inkubierten Zellen mit über Kopf gelagerten Zellen zu erkennen. Es zeigt sich in serumfreiem Medium eine Verringerung der zytotoxischen Wirkung der Silberspezies, da die instabile Suspension nicht auf die Zellen sedimentiert, sondern von diesen durch die Gravitation ferngehalten werden (siehe Abschnitt 5.3.7, Seite 77).

Einen Einfluss auf das Zusammenspiel von Partikel, Medium, Ionenfreisetzung und Zytotoxizität kann zudem die Beschichtung oder der Stabilisator der Nanopartikel haben. So haben Bedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke und der Elektrolyttyp einen Einfluss auf die Oberflächenladung und die Aggregation von Silbernanopartikeln, je nach dem womit diese stabilisiert sind [Badawy *et al.*, 2010]. Dies äußert sich für verschieden beschichtete Silbernanopartikel, von denen jedoch die Ionenfreisetzung nicht bekannt ist, beispielsweise in Unterschieden in der Zytotoxizität für verschiedene Zelllinien [Lin *et al.*, 2012b; Sur *et al.*, 2012]. Durch den Einfluss auf physikochemische Eigenschaften, wie die Oberflächenladung, Bindung der Beschichtungsmoleküle an die Partikeloberfläche und das damit beeinflusste Aggregationspotenzial, kann die Zytotoxizität von Silbernanopartikeln gesteuert werden [Suresh *et al.*, 2012]. Die in dieser Arbeit betrachteten Silbernanopartikel mit Beschichtungen aus Tannin, PVP, dem Peptid CKK sowie ein unbeschichtetes Nahrungsergänzungsmittel zeigen keine Unterschiede in der Zytotoxizität mit Ausnahme des Nahrungsergänzungsmittels (siehe Abschnitt 5.2.4, Seite 59). Der Grund dafür kann somit nicht in der unterschiedlichen Stabilität der verschiedenen Partikel liegen (siehe Abschnitt 4.1 Seite 24). Vielmehr erklärt die gemessene Ionenfreisetzung das Bild. Diese ist für das toxischere Nahrungsergänzungsmittel deutlich höher (siehe Abschnitt 5.3.1, Seite 61) und wird vermutlich durch die geringere Größe und die fehlende Beschichtung begünstigt. Eine ebenfalls vergleichbare Toxizität auf Bakterien, trotz andersgearteter Beschichtung der Silbernanopartikel mit unbekannter Ionenfreisetzung, finden Kvitek *et al.* und führen dies auf die Art der Stabilisierung durch die gewählte Beschichtung aus nicht-ionischen Tensiden zurück [Kvitek *et al.*, 2008]. Tween 80 und PVP 360 sowie die hier verwendeten Beschichtungen sorgen für eine sterische Stabilisierung der Partikel (siehe Abschnitt 4.1 Seite 24).

Zusammenfassend zeigt sich, dass beim Vergleich unterschiedlicher Arbeiten und verschiedener Zelllinien bedacht werden sollte, dass das Inkubationsvolumen und die Konzentrationsangabe sowie deren Umrechnung einen Einfluss auf das Ergebnis haben können. Auch die Zusammensetzung des Mediums kann, über den Einfluss auf die Stabilität und die Proteinkorona der Nanopartikel, Einfluss auf die Zytotoxizität nehmen. Ebenso kann die Art der Beschichtung eine Rolle spielen. Deutliche Unterschiede zeigen sich vor allem für Partikel, die eine andere Ionenfreisetzung haben. Es zeigt sich, dass es sich um ein sehr komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Nanopartikeleigenschaften, Assayeigenschaften und

Zelleigenschaften handelt, das mit dem in dieser Arbeit verwendeten Set von 5 Nanopartikeln und 4 Zelllinien nicht weiter aufgeklärt werden kann.

6.3 Wirkungsmechanismus von Silbernanopartikeln in Intestinalzellen

Grundlegend für eine Risikobewertung ist das Verständnis des genauen Wirkungsmechanismus von Silbernanopartikeln. Wie bereits diskutiert, werden die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel nicht in größerer Menge in Caco-2 Zellen aufgenommen. Sie haben jedoch eine deutliche zytotoxische Wirkung auf die Zellen. In diesem dritten Abschnitt soll der Wirkungsmechanismus der Silbernanopartikel näher betrachtet werden. Zunächst stellt sich die Frage, ob die nanopartikuläre Form einen Einfluss hat oder die Wirkung der Nanopartikel ausschließlich durch die freigesetzten Ionen vermittelt wird.

Dies ist eine in der Literatur bereits viel diskutierte Frage. Zu deren Beantwortung wurden in dieser Arbeit mehrere Ansätze gewählt. Der erste Ansatz wurde in Anlehnung an die Arbeit von Beer *et al.* durchgeführt. Dort werden die Silberionen mittels Ultrazentrifugation von den Silbernanopartikeln getrennt und indirekt vergleichend über die Zytotoxizität auf der humanen Lungenepithelzelllinie A549 betrachtet. Dabei zeigt sich, dass nur bei Nanopartikelsuspensionen, die weniger als 2,6 % des Silbers als Ionen enthalten, die Suspension einen größeren zytotoxischen Effekt zeigt als der ionenhaltige Zentrifugationsüberstand [Beer *et al.*, 2012]. Der hier durchgeführte analoge Ansatz mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln auf proliferierenden Caco-2 Zellen zeigt eine deutlich geringere Zytotoxizität des Zentrifugationsüberstandes im Vergleich zu den frisch angesetzten Nanopartikelverdünnungen. Dies unterstützt zusammen mit der gemessenen geringen Ionenfreisetzung (siehe Abschnitt 5.3.1.1 Seite 61) die Theorie von Beer *et al.* Ein Kontrollansatz mit Silbernitrat zeigt jedoch ebenfalls eine geringere Zytotoxizität des Überstandes im Vergleich zur unzentrifugierten Lösung. In dieser Kontrolle zeigt sich, dass die Vorinkubation und Zentrifugation vor der Inkubation auch einen Teil der Silberionen abtrennt. Dies deutet darauf hin, dass Silberionen mit den Bestandteilen des Zellkulturmediums interagieren und durch Zentrifugation ebenfalls entfernt werden können. Dies wird von Beer *et al.* nicht betrachtet.

Die Verwendung der oben diskutierten Daten zur Darstellung der Zytotoxizität der verschiedenen Silberspezies über den Gehalt an gelöstem Silber im Überstand anstelle der eingesetzten Konzentration zeigt in Abbildung 39, dass die Kurven für die Silbernanopartikel und Silbernitrat vergleichbar werden. Dies spricht dafür, dass die gesamte zytotoxische Wirkung, die die Silbernanopartikel auf die Caco-2 Zellen haben, auf die von ihnen freigesetzten Silberionen zurückzuführen sein könnte. Dabei ist jedoch zu beachten, dass dieser Versuchsansatz nicht die Kinetik der Ionenfreisetzung durch die Nanopartikel widerspiegelt.

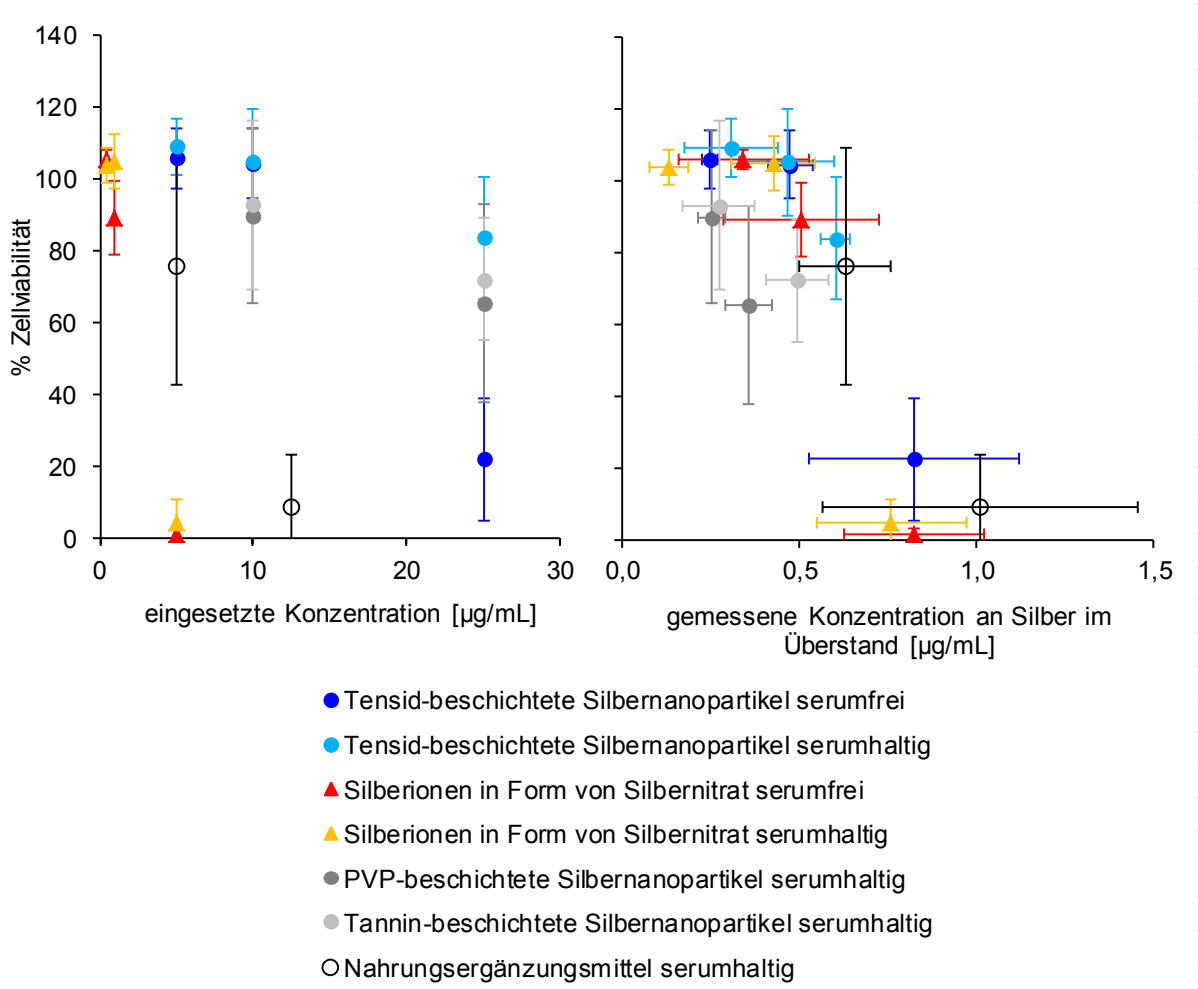

Abbildung 39: Vergleich der Viabilität proliferierender Caco-2 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Silberspezies und der im Zentrifugationsüberstand befindlichen Menge an Silber im Zellkulturmedium. 10 000 Caco-2 Zellen/*well* wurden 24 h kultiviert, weitere 24 h mit Silberionen oder verschiedenen Silbernanopartikeln inkubiert und die Zellviabilität mit Hilfe des CTB Assays bestimmt. Die Ergebnisse sind auf die Mediumkontrolle bezogen dargestellt. Die Werte sind über der eingesetzten Konzentration der Silberspezies sowie über dem Gehalt an löslichen Silberionen dargestellt. Der Gehalt an löslichen Silberionen wurde nach 24 h Inkubation der verschiedenen Silberspezies im Zellkulturmedium mittels Ultrazentrifugation und anschließendem Hochdruckmikrowellenaufschluss und ICP-MS Messung im Überstand bestimmt.

Um der Freisetzung der Ionen über die Zeit mit gleichzeitiger Trennung von Nanopartikeln und Ionen näherzukommen, wurde ein Versuchsansatz, der auf einer Gleichgewichtsdialyse basiert, mit anschließender quantitative *real time* RT-PCR Analyse gewählt (siehe Abschnitt 5.3.1.2 Seite 64). Dieser zeigte für die durch Silbernanopartikel regulierten Gene eine vergleichbare Tendenz der Regulation durch die Ionen, die jedoch wesentlich schwächer ist. Dies deutet auf eine gleiche Reaktion der Zellen gegenüber den Partikeln und den Ionen hin.

Folgende drei Literaturbeispiele komplexer Transkriptomanalysen zeigen die Erkenntnisentwicklung der letzten Jahre und die Schwierigkeit der Trennung der Wirkungen von Silbernanopartikeln und den von ihnen freigesetzten Ionen. Kawata *et al.* schlossen aus ihren Experimenten mit unzureichend charakterisierten Silbernanopartikeln im Vergleich zu

Polysterennanopartikeln und Silberkarbonat an HepG2 Zellen, dass die Wirkung der Partikel sowohl durch die Ionen als auch die Partikel selbst vermittelt wird [Kawata *et al.*, 2009]. Bouwmeester *et al.* schlussfolgern aus den vergleichbaren Expressionsprofilen ihrer Micro-Array Analyse von Silbernanopartikeln und Silbernitrat für 4 h auf dem M-Zell Modell (Caco-2 und Raji Lymphozyten), dass die Wirkung der Silbernanopartikel durch die Ionen hervorgerufen wird [Bouwmeester *et al.*, 2011]. Foldbjerg *et al.* kommen aufgrund ihrer Micro-Array Analysen an den Lungenepithelzellen A549, die mit gut charakterisierten Silbernanopartikeln im Vergleich zu Silberionen (auf der Grundlage der Ionenfreisetzung berechnete Summe an Ionen, die sich über die Inkubationszeit aufsummiert) für 24 und 48 h inkubiert wurden, zu dem Schluss, dass beide Silberspezies sehr vergleichbare Expressionsprofile zeigen. Dabei ist die Wirkung der Silbernanopartikel komplexer und persistenter, während die Silberionen eine schnellere Reaktion hervorrufen [Foldbjerg *et al.*, 2012].

Es bleibt eine technische Herausforderung, die Wirkung der Nanopartikel von der Wirkung der von ihnen freigesetzten Ionen zu trennen, da es sich um ein komplexes Gleichgewicht zwischen Silbernanopartikeln, Silberionen und weiteren Reaktionspartnern handelt. Als Edelmetall wird Silber in wässrigem Milieu von Wasser und Säuren nicht angegriffen [Chernousova und Epple, 2013]. Es gibt dennoch kontinuierlich kleine Mengen an Ionen ab [Glover *et al.*, 2011; Chernousova und Epple, 2013]. Die genauen Vorgänge wurden bisher nur in einfachen Modellsystemen mit einer überschaubaren Anzahl an Komponenten in Lösung genau untersucht und in Abbildung 40 schematisch zusammengefasst.

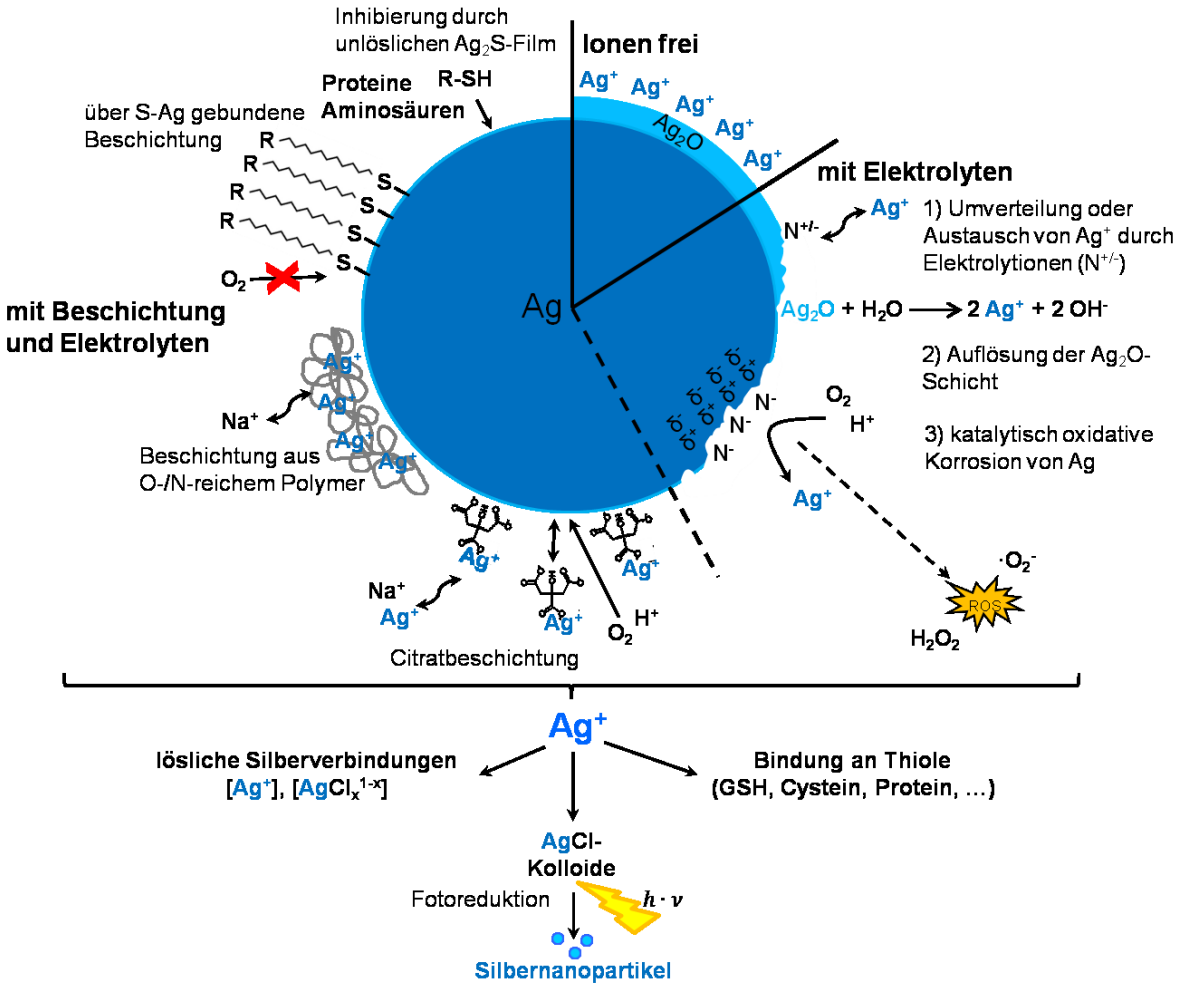

Abbildung 40: Übersicht über die möglichen Wechselwirkungen und die Ionenfreisetzung von Silbernanopartikeln in wässriger Lösung [modifiziert nach Liu *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2012].

So zeigt sich in wässrigen Lösungen, dass die Ionenfreisetzung von Silbernanopartikeln ein kooperativer Oxidationsprozess ist, eine Reaktion mit gelöstem Sauerstoff, die durch Protonen und andere in Lösung befindliche Stoffe vermittelt wird. Die nachfolgende chemische Gleichung gibt die Stöchiometrie der Reaktion wieder [Liu und Hurt, 2010].

$$4\,Ag_{(s)} + O_{2(aq)} + 4H^{+}_{(aq)} \rightleftharpoons 4Ag^{+}_{(aq)} + 2H_2O_{(l)} \qquad \text{mit } \Delta G = -91{,}3\ \text{kJ/mol bei } 298\ \text{K}$$

Xiu *et al.* zeigen, dass unter Ausschluss von Sauerstoff Silbernanopartikel keine Ionen freisetzen und nicht toxisch auf Bakterien wirken [Xiu *et al.*, 2012]. Unter Anwesenheit von Sauerstoff können die Partikel als Depot für Silberionen verstanden werden. Dabei wird die Freisetzung durch mehrere Faktoren beeinflusst. Die Ionenfreisetzungsrate steigt mit der Temperatur und sinkendem pH Wert, dem Gehalt an neutralem organischem Material oder einem Überschuss an Citrat. Die bei der Oxidation entstehenden Peroxidintermediate, einschließlich H_2O_2 [Liu und Hurt, 2010], könnte neben den Silberionen einen Beitrag zur zytotoxischen Wirkung leisten. Der Salzgehalt hat nur einen geringen Einfluss auf die Ionenfreisetzung [Liu und Hurt, 2010]. Auch die Größe der Nanopartikel, deren Konzentration, die Oberflächenbeschaffenheit,

-funktionalisierung oder -beschichtung und die Zusammensetzung des umgebenden Mediums haben Einfluss auf die Ionenfreisetzung von Nanopartikeln [Kittler *et al.*, 2010a; Liu *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2011c]. Silbernanopartikel können sich wiederum an anderen Stellen durch chemische Reduktion oder Fotoreduktion wieder bilden [Glover *et al.*, 2011]. Dies erklärt die blau-schwarze Verfärbung der Haut von Agyriepatienten [Liu *et al.*, 2012]. Die freigesetzten Silberionen reagieren anschließend in komplexen biologischen Medien mit den enthaltenen Kationen zu einem vielfältigen Speziesgemisch aus diversen Salzen und Komplexen und binden an organischen Molekülen. So führt das in biologischen Medien wie Blut oder Zellkulturmedium immer vorliegende Chlorid zur Ausfällung von schwer löslichem Silberchlorid. Die freigesetzten, hydratisierten Silberionen reagieren mit Chloridionen nicht nur zu Silberchlorid, es können sich aus dem Niederschlag an schwer löslichen Silbersalzen auch kolloidal-dispergierte Partikel bilden. Das Löslichkeitsprodukt von Silberchlorid beträgt $1{,}7 \cdot 10^{-10}\ mol^2/L^2$, sodass sich eine Gleichgewichtslöslichkeit von 1,4 mg/L Silber in reinem Wasser ergibt [Chernousova und Epple, 2013]. Für das serumfreie Zellkulturmedium DMEM, das eine Chloridkonzentration von etwa 119 mM aufweist, ergibt sich aus der Berechnung eine Gleichgewichtskonzentration von 0,15 µg/L Silberionen. Die in dieser Arbeit gemessenen Gehalte an Silber im Zentrifugationsüberstand liegen jedoch höher (siehe Abschnitt 5.3.1.1 Seite 61). Dies lässt sich im Vergleich zu der vereinfachten Berechnung auf der Grundlage des Löslichkeitsproduktes von Silberchlorid mit der Komplexierung der Silberionen durch im Überschuss vorhandenes Chlorid erklären [Liu *et al.*, 2010a]. Neben der Wechselwirkung mit Chlorid haben die freigesetzten Silberionen als weiche Lewis-Säure eine hohe Affinität zu Schwefel und Selen, aber auch zu Stickstoff [Liu *et al.*, 2012; Chernousova und Epple, 2013]. Dabei ist vor allem die Reaktion der Silberionen mit Thiolen in biologischen Systemen von Interesse [Liu *et al.*, 2010a]. Diese diversen Reaktionspartner machten eine Vorhersage der genauen Wechselwirkungen von Silberionen in Zellkulturmedium unmöglich. Analytisch lassen sich die einzelnen Silberspezies nicht ohne Weiteres unterscheiden [Chernousova und Epple, 2013]. Neben den hydratisierten Silberionen können komplexierte und oder an Proteine gebundene Silberionen sowie kolloidale Silbersalze, je nach vorgeschalteter Trennmethode, von der Elementanalyse mit erfasst werden. Die vielen Interaktionsmöglichkeiten der Silberionen können sowohl zu einer Detoxifizierung der Silberionen als auch zu ihrer toxischen Wirkung beitragen. So können Silberionen mit Thiol- und Aminogruppen von Proteinen, mit Nukleinsäuren und mit Zellmembranen reagieren und dadurch zelluläre Funktionen stören [Powers *et al.*, 2011]. Durch die Bindung an organische Moleküle, wie Bestandteile des Zellkulturmedium kann die Toxizität des Silbers deutlich verringert werden [Kittler *et al.*, 2010b]. Auch die Bildung von Silberchlorid und kolloidalem Niederschlag dieses Salzes verringert die toxische Wirkung von Silberionen. So sinkt durch die Bildung von Silberchloridkolloiden der hämolytische Effekt für Erythrozyten von Ratten und Kaninchen für höhere Silberkonzentrationen wieder [Zhang *et al.*, 2013].

Vor diesem Hintergrund lassen sich die oben genannten Ergebnisse des Dialyse-PCR-Ansatzes, in dem die durch eine Dialysemembran von den Zellen getrennten Partikel eine vergleichbare zelluläre Reaktion mit deutlich geringerer Intensität zeigen, wie folgt erklären. Die Nanopartikel setzen Ionen frei, die durch die Dialysemembran in Richtung der Zellen diffundieren. Dabei reagieren jedoch mehr Ionen mit Bestandteilen des Zellkulturmediums als mit den Zellen. Möglich ist auch, dass die Ionen, die von Partikeln stammen, die direkten Kontakt mit den Zellen haben, mit größerer Wahrscheinlichkeit mit den Zellen und weniger mit Mediumbestandteilen wechselwirken, wodurch die zelluläre Wirkung größer ist. Ebenso ist denkbar, dass der Kontakt der Partikel mit den Zellen einen zusätzlichen direkten Einfluss auf diese hat.

Somit zeigt sich, dass die Silberionen eine entscheidende Rolle für die Wirkung von Silbernanopartikeln spielen. Jedoch kann nicht endgültig zwischen Partikeln und Ionen unterschieden werden, da es sich um ein kompliziertes Wechselspiel zwischen den beiden Partnern handelt. Dies ist vor allem in komplexen Lösungen wie Zellkulturmedien der Fall. Dabei setzen die Partikel Ionen an ihrer Oberfläche frei, wobei reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Die freien Ionen reagieren mit diversen anderen Stoffen und können sich auch wieder zu Partikeln zusammenschließen. Es liegt nahe, dass die nanopartikuläre Form zumindest als Transportvehikel und Silberspeicher, aus dem kontinuierlich Ionen freigesetzt werden, fungieren kann.

Neben der Frage nach der genauen Wirkspezies soll im Weiteren die Wirkung der Silbernanopartikel auf Enterozyten betrachtet werden. Wie bereits diskutiert, werden die Silbernanopartikel nicht in größerer Zahl in die Caco-2 Zelle aufgenommen. Da zudem die von ihnen freigesetzten Silberionen positiv geladen sind, ist für diese nur die Aufnahme durch ein Transportsystem in die Zelle zu vermuten [Suzuki *et al.*, 2011]. Dafür kommt zum Beispiel der Kupfertransporter CTR1 infrage [Gupta und Lutsenko, 2009]. Aufgrund dessen ist vor allem eine Reaktion der Silberspezies mit Proteinen auf der Zelloberfläche wahrscheinlich [Suzuki *et al.*, 2011]. Auf diese Weise könnten sie zum Beispiel in die *outside in*-Signalwege der Zellen eingreifen. Diese regulieren unter anderem die Zelladhäsion, die Zytoskelettorganisation und Ausbreitung der Zellen über membranständige Proteine [Honore *et al.*, 2000]. Durch die hohe Affinität des Silbers vor allem zu Thiolgruppen könnten aber auch andere extrazelluläre und transmembranständige Proteine, wie Wachstumsfaktorrezeptoren, gestört werden, die den Stoffwechsel ebenfalls beeinflussen. In der Stoffwechselweganalyse mit der *Ingenuity Pathway Analyse* (IPA) *Software* der Micro-Array Daten zeigen sich membranständige Proteine, wie Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone sowie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, aber vor allem Integrine, als reguliert oder an Stoffwechselwegen beteiligt. Weiterhin beeinflusst wird die Expression von Matrixbestandteilen wie Collagen und Fibronektin und Proteinen, die die extrazelluläre Matrix beeinflussen, wie die Metallopeptidasen. Letzteres zeigt

sich auch in Untersuchungen von Park *et al.* mit Silbernanopartikeln an den Makrophagen der Maus RAW264.7 [Park *et al.*, 2010].

Für die im Micro-Array als differenziell reguliert beobachteten Gene ist die Aktivierung oder Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren notwendig. Diese später diskutierten Transkriptionsfaktoren können durch verschiedene Signalwege beeinflusst werden. Da diese jedoch meist durch schnelle enzymatische Proteinmodifikationen ein und aus geschaltet werden [Whitmarsh und Davis, 1996], zeigen sie sich nicht direkt in der Transkriptomanalyse, sondern werden von der IPA *Software* aufgrund des Vergleichs der regulierten Gene mit Daten aus der Literatur als wahrscheinlich in die Signalweiterleitung involviert betrachtet. In der Kategorie betroffene Stoffwechselwege finden sich unter anderem Kinase-abhängige Stoffwechselwege, wie der mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK), extrazelluläres-Signal-regulierte-Kinase (ERK), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Fokale Adhäsion Kinase (FAK / PTK2) Signalweg auf. Die Fokale Adhäsion Kinase (FAK) ist lokalisiert an den *Focal Adhesions*, den Bindungsstellen der extrazellulären Matrix mit dem Zytoskelett und involviert in den Umbau dieser während der Migration [Giannone, 2002]. Einen Hinweis auf MAPK finden auch Foldbjerg *et al.* in ihren Micro-Array Daten der Lungenepithelzellline A549 nach Silbernanopartikelinkubation [Foldbjerg *et al.*, 2012]. Kang *et al.* zeigen, dass für die Induktion der Expression von Hämoxygenase 1 (HMOX1) durch Silbernanopartikel in der Ovarienkarzinomzelllinie SK-OV3 die Signalwege PI3K und p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38MAPK) eingeschaltet werden [Kang *et al.*, 2012b].

Einen Überblick über den Zeitverlauf und einen weiteren Hinweis auf die Wirkungsweise der Silbernanopartikel geben die Impedanzmessungen (siehe Abschnitt 5.3.3, Seite 68). Mit den Kurven der proliferierenden Caco-2 Zellen vergleichbare Ergebnisse zeigen sich in der humanen Bronchialepithelzelllinie 16HBE14o- für Silbernanopartikel [Otero-González *et al.*, 2012].

Zur Korrelation zwischen Wirkungsweise und Kurvenverlauf wurden umfangreiche Chemikalienbibliotheken (darunter jedoch keine Nanopartikel) auf der Lungenepithelzelllinie A549 gescreent und Kategorien gebildet. Stoffe, die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren oder den Calciumgehalt der Zellen beeinflussen, zeichnen sich durch einen Abfall der Kurve kurz nach Inkubationsbeginn aus, der sich kurze Zeit später ganz oder teilweise regeneriert [Abassi *et al.*, 2009]. Vergleichbare Kurvenverläufe zeigen vor allem die differenzierten Caco-2 Zellen. In Übereinstimmung damit finden sich in der IPA Analyse unter den vorgeschalteten Regulatoren die vier G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CCR9, F2R, CXCR4 und CHRM1 (siehe Abschnitt 5.3.9 Seite 79 und Anhang). Dabei ist zum Beispiel von CCR9 und CXCR4 bekannt, dass sie einen Calciumioneneinstrom verursachen [Hatse *et al.*, 2002]. Weitere Kategorien für spätere Kurvenverläufe beinhalten Stoffe, die unter anderem einen Einfluss auf die DNA- und

Nukleotidsynthese haben [Abassi *et al.*, 2009]. Diese ähneln den Kurvenverläufen der Silbernanopartikel und des Silbernitrats.

Aufgrund der Hinweise durch die Impedanzmessungen und Micro-Array Daten auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Calciumhomöostase erfolgte eine Untersuchung des Calciumeinstroms anhand eines einfachen Fluoreszenzassays. Hier zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des calciumabhängigen Fluoreszenzsignals (siehe Abschnitt 5.3.6, Seite 75). Vergleichbares beobachten Stoehr *et al.* in der humanen Lungenepithelzelllinie A549 nach Inkubation mit Silberfasern [Stoehr *et al.*, 2011]. Seit den 1980er Jahren zeigen diverse Arbeiten einen Einfluss von Silberionen auf den Calciumhaushalt, unter anderem durch Hemmung von ATPasen und Einfluss auf andere Calciumionenkanäle oder andere Ionenkanäle [Salama und Abramson, 1984; Gould *et al.*, 1987; Prabhu und Salama, 1990; Oba *et al.*, 1992; Dart, 1998; Tupling und Green, 2002; Gromová *et al.*, 2003]. Da viele Moleküle, die für Signaltransduktionen zuständig sind, wie zum Beispiel Calciumkanäle, für ihre Funktion entscheidende Cysteine besitzen, könnten sich die Silberionen direkt an Thiolgruppen binden oder durch die von ihnen freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies indirekt, über den Einfluss auf den Redoxstatus der Thiolgruppen, die Funktion der Proteine stören [Suzuki *et al.*, 2011]. Beobachtungen von Haase *et al.* mit Peptid-beschichteten Silbernanopartikeln in Neuronalzellen unter Verwendung vom Antioxidant *N*-Acetylcystein zeigen, dass der Calciumflux nicht ausschließlich durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird [Haase *et al.*, 2012b]. Üblicherweise laufen calciumionenabhängige Signalsysteme über die Generierung von schnellen Calciumionenpulsen in Form von Calciumionen, die vermehrt in das Zytosol einströmen und augenblicklich wieder entfernt oder gebunden werden. In einigen Fällen kann der Calciumioneneinstrom länger andauern. Für eine Wirkung auf die Transkription und Proliferation müssen die Calciumionen über Minuten bis Stunden wirken. Während dieser verlängerten Stimulation wiederholt sich der Calciumeinstrom als regelmäßige Calciumoszillation. An der Decodierung von frequenzmodulierten Calciumsignalen sind unter anderem die Ca^{2+}/calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und die Proteinkinase C (PKC) beteiligt [Berridge *et al.*, 2003]. Die Gruppe der PKC wird in der IPA Analyse als aktiviert betrachtet. Neben anderen Vorgängen wird die Zellmigration durch calciumionenabhängige Signalsysteme gesteuert und korreliert mit der Amplitude und Frequenz der Calciumionenpeaks, wodurch unterschiedliche Schritte während der Migration reguliert werden können. Der Kontakt zwischen extrazellulärer Matrix und Integrin sowie zwischen Integrin und Zytoskelett wird durch diverse Calciumproteine reguliert. So wird zum Beispiel die Unterbrechung der Integrin-vermittelten Adhäsion durch calciumionensensitive Proteine, wie Calpain, *Myosin light-chain kinase* (MLCK) und Calcineurin, reguliert. Die calciumabhänige Protease Calpain unterbricht die Integrin-Zytoskelett Bindung. Calretikulin scheint essenziell für Integrin-vermittelte Calciumsignalwege und die Adhäsion zu sein. Calcineurin, eine Proteinphosphatase, ist am Integrinrecyceling beteiligt. Die

Phosphorylierung und damit Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) wird durch eine Erhöhung des intrazellulären Calciumionengehalts induziert. Dies deutet darauf hin, dass die Fokale Adhäsion Kinase (FAK) ein Ziel der Calciumionen im Verlauf der Migration ist [Giannone, 2002]. Das Calciumsignaling spielt zudem eine Rolle beim Verlust der *Tight Junctions*. So zeigt sich in Caco-2 Zellen ein Calciumionensignal ausgelöst von Bakterienproteinen nach 5 bis 25 min und durch nicht verdaubare Saccharide ein sofortiger Anstieg der Kurve, der bis mindestens 15 min erhalten bleibt. [Suzuki und Hara, 2004; Vikström *et al.*, 2010].

Bereits bei der mikroskopischen Kontrolle der Zellen während der Zellviabilitätsassays fiel auf, dass es bei den Caco-2 Zellen aufgrund der Inkubation mit Silbernanopartikeln und Silberionen zu morphologischen Veränderungen in Form eines Ablösens vom Boden und dem Zellverband kam. Diese ist vor allem in proliferierenden Caco-2 Zellen deutlich zu erkennen (siehe Abschnitt 5.3.2, Seite 66). Ähnliche Beobachtungen, beschrieben als irreguläre Form, Schrumpfen oder Abrunden der Zellen sowie geschwollene und abgelöste Zellen, werden auch von anderen Arbeitsgruppen nach Inkubation mit verschiedenen Silbernanopartikeln und Silbernitrat gemacht [Kawata *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010b; Nowrouzi *et al.*, 2010]. Damit in Übereinstimmung ist in den Transkriptomanalysen an differenzierten Caco-2 Zellen eine Runterregulation von Genen, die für die Bildung von *Tight* und *Adherense Junctions* verantwortlich sind, zu erkennen. Deng *et al.* beobachten einen Einfluss von Silbernanopartikeln in A549 Zellen auf die *Gap Junctions* [Deng *et al.*, 2010]. Neben den Zell-Zell-Kontakten sind auch die Zell-Matrix-Kontakte betroffen. So werden unter anderem Gene, die für Bestandteile der extrazellulären Matrix codieren, beeinflusst, wie zum Beispiel Metallopeptidasen. Weiterhin zeigt sich in der Regulation von β-Aktin und Tubulin ein deutlicher Einfluss auf das Zytoskelett. Dabei ist die Induktion des RNA-Gehalts von β-Aktin (ATCB) hervorzuheben, da es in anderen Arbeiten oft als Referenzgen verwendet wird. Eine Induktion der β-Aktinexpression wird ebenfalls in der Rattenlunge nach der intravenösen Gabe von Silbernanopartikeln beobachtet [Kim *et al.*, 2010a]. Einen Einfluss auf die Zellstruktur und Migration beobachten auch Bouwmeester *et al.*, Kawatar *et al.* und Foldbjerg *et al.* im M-Zell Modell sowie an HepG2 und A549 Zellen, die mit Silbernanopartikeln inkubiert wurden [Kawata *et al.*, 2009; Bouwmeester *et al.*, 2011; Foldbjerg *et al.*, 2012].

Die morphologischen Veränderungen und der Verlust der Zelladhäsion und der Zell-Zell-Kontakte können in Epithelzellen zur Induktion von Anoikis führen. Anoikis ist eine spezielle Form der Apoptose, die durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes vermittelt wird. Dabei spielen vor allem die Integrine eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung [Chiarugi und Giannoni, 2008; Morozevich *et al.*, 2003]. Diese Induktion von Apoptose aufgrund des Verlustes der Zell-Matrix-Kontakte kann von Vachon *et al.* in Caco-2 Zellen gezeigt werden [Vachon *et al.*, 2002]. Die hier durchgeführten Apoptosemessungen zeigen für die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel keine Induktion von Apoptose in Caco-2 Zellen (siehe Abschnitt 5.3.4,

Seite 71). Weiterhin deuten die Ergebnisse des PCR-Array und der IPA Analyse auf eine Apoptosehemmung hin. In anderen Epithelzellen, wie den Embryonalstammzellen und embryonalen Fibroblasten der Maus (mES und MEF), der humanen Colonkarzinomzelllinie HT-29 und der Lungenepithelzelllinie A549 wird hingegen eine Induktion von Apoptose durch unzureichend charakterisierte Silbernanopartikel beobachtet [Ahamed *et al.*, 2008; Gopinath *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011]. Die Hepatozytenzelllinie HepG2 zeigt wiederum keinen bis geringen Anstieg an Apoptose für PVP-beschichtete Silbernanopartikel [Liu *et al.*, 2010b]. Eigene Untersuchungen mit Peptid-beschichteten Silbernanopartikeln in HepG2 Zellen zeigen eine leichte Induktion von Apoptose [Böhmert *et al.*, 2012], während sich in proliferierenden Caco-2 Zellen keine Induktion der Apoptose messen lässt. Der Grund für diese widersprüchlichen Beobachtungen könnte zum einen in der teilweisen Apoptoseresistenz der Caco-2 Zellen [Morozevich *et al.*, 2003] und zum anderen in den regulierten Stoffwechselwegen zu finden sein. In die Induktion von Anoikis in Epithelzelle sind verschiedene Signalwege involviert. Hinweise auf eine Hochregulation der Stoffwechselwege, die über die Kinasen FAK, ERK, MAPK und ILK sowie Integrine verlaufen, die für das Überleben der Zellen bzw. die Induktion von Anoikis verantwortlich sind, finden sich in den Transkriptomanalysen der differenzierten Caco-2 Zellen (siehe siehe Abschnitt 5.3.9 Seite 79 und Anhang) [Attwell *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 2007]. Auch die Induktion von Apoptose über die Störung des mitochondrialen Transmembranpotenzials und eine daraus resultierende Entkopplung des oxidativen Phosphorylierungssystems durch Silbernanopartikel und einen durch sie erhöhten Calciumeinstrom in die Mitochondrien [Almofti *et al.*, 2003; Lemasters *et al.*, 2009; Teodoro *et al.*, 2011] können hier für Tensid-beschichtete Silbernanopartikel und Silberionen in Caco-2 Zellen nicht nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.3.6, Seite 75).

Andere Arbeiten zeigen, dass die Erhöhung von oxidativem Stress auch eine Rolle bei der Anoikisresistenz spielen kann [Chiarugi und Giannoni, 2008]. Dabei ist die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Silbernanopartikel auf zwei Wegen denkbar: 1) Die direkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Reaktion von Silber mit Sauerstoff in einer Fenton-artigen Reaktion bei der Freisetzung von Silberionen von den Nanopartikeln. 2) Die indirekte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Störung der Atmungskette [Bouwmeester *et al.*, 2011]. Eigene Versuche zeigen eine Erhöhung des oxidativen Stresses in Caco-2 Zellen durch die Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silbernitrat (siehe Abschnitt 5.3.5, Seite 73), die sich auch in der Induktion der Transkription von Genen, wie Hämoxygenase 1 (HMOX1), Hitzeschockproteinen, Metallothioneinen und anderen widerspiegelt (siehe Abschnitt 5.3.9, Seite 79). Ein Versuch mit über Kopf inkubierten Zellen zeigt, dass es sich weniger um einen mechanischen Stress durch aggregierte und sedimentierte Nanopartikel handeln kann (siehe Abschnitt 5.3.7, Seite 77). Diverse Arbeitsgruppen können ebenfalls die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Silbernanopartikel und Silberionen

in verschiedenen Assays an der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2 und der humanen Lungenepithelzelllinie A549 messen [Liu *et al.*, 2010b; Nowrouzi *et al.*, 2010; Foldbjerg *et al.*, 2011]. Die Tensid-beschichteten Silbernanopartikel zeigen auch in der Hepatozytenzelllinie C3A einen Anstieg des oxidierten Glutathiongehaltes [Kermanizadeh *et al.*, 2012b]. Der von Peptid-beschichteten Silbernanopartikeln verursachte oxidative Stress in THP-1 Makrophagen zeigt sich unter anderem in Veränderungen der Membranzusammensetzung [Haase *et al.*, 2011]. Rasterkraftmikroskopuntersuchungen der humanen Colonkarzinomzelllinie HT-29 und der Hamsternierenzelllinie BHK21 zeigen nach der Behandlung mit Silbernanopartikeln eine Zelloberfläche, die rauer als die von unbehandelten Zellen ist, was ebenfalls auf eine Veränderung der Membranstruktur hindeutet [Gopinath *et al.*, 2010]. Diese beiden Arbeiten lassen eine Verbindung zwischen dem oxidativen Stress und den oben betrachteten morphologischen Veränderungen vermuten.

Oxidativer Stress kann eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren aktivieren. Dazu gehören unter anderem *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFkB), *activator protein 1* (AP-1), Tumorprotein P53, Hypoxie-induzierter Faktor (HIF-1α), Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR-γ) und *Nuclear factor erythroid-derived 2-like* 2 (NRF2) [Reuter *et al.*, 2010]. Von diesen Transkriptionsfaktoren sind NFkB und NRF2 in dieser Arbeit als aktivierte vorgeschaltete Regulatoren in der IPA Analyse zu finden (siehe siehe Abschnitt 5.3.9 Seite 79 und Anhang). NRF2 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem die basale und induzierbare Expression von Phase II Enzym reguliert [Kang *et al.*, 2004]. Das Protein wird durch *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) im Zytoplasma an das Zytoskelett gebunden [Mann *et al.*, 2007]. NRF2 wird neben oxidativem und elektrophilem Stress auch durch die Störung des Aktinzytoskeletts aktiviert [Kang *et al.*, 2004]. Es löst sich von KEAP1, wandert in den Zellkern und bindet dort an bestimmte Sequenzen [Mann *et al.*, 2007]. Dies führt unter anderem zu einer erhöhten Expression von Hämoxygenase 1 (HMOX1), *NAD(P)H dehydrogenase quinone 1* (NQO1), Glutathion-S-Transferase (GSTA2) und anderen Genen, die für Proteine codieren, die reaktive Sauerstoffspezies sowie Elektrophile neutralisieren, Glutathion biosynthetisieren und oxidierte Proteine recyceln [Simmons *et al.*, 2011]. In die Regulation involviert sind wahrscheinlich Proteinkinase C (PKC), MAPKs und PI3K [Mann *et al.*, 2007]. Ein NRF2-spezifischer Reportergen-Assay zeigt für Silberchlorid in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T, der humanen Gliobastomazelllinie A172, der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 und der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2 eine deutliche Induktion. Dies wird jedoch nicht in der humanen Lungenepithelzelllinie A549 beobachtet, was die Autoren zum einen auf den in A549 Zellen beobachteten sehr hohen Glutathiongehalt, der die Zellen vor oxidativem Stress schützt, und zum anderen auf eine Mutation in KEAP1, dem Protein, das als Ankerprotein für NRF2 im Zytoplasma fungiert, zurückführen. Die genannte Mutation führt zu einem vermehrten Abbau und damit zu einer verminderten Induzierbarkeit

von NRF2 [Simmons *et al.*, 2011]. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass Foldbjerg *et al.* in ihrer Micro-Array Analyse der Wirkung von Silbernanopartikeln und Silbernitrat auf A549 Zellen diesen Stoffwechselweg nicht betrachten [Foldbjerg *et al.*, 2012]. Eom *et al.* beobachten in den humanen T-Zellen Jurkat eine Aktivierung von NRF2 und NFkB durch p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (P38-MAPK) Signalwege durch Silbernanopartikel [Eom und Choi, 2010]. Kang *et al.* fanden in der humanen Nierenepithelzelllinie HK-2, dass die NRF2-vermittelte Induktion von Glutathion vor DNA-Schäden und Zellzyklusarrest durch Silbernanopartikel schützt [Kang *et al.*, 2012a]. In nicht zytotoxischen Konzentrationen reprimiert Silbernitrat jedoch in humanen Hautfibroblasten die Expression von Antioxidanzgenen, wie dem Transkriptionsfaktor NRF2 und deren Zielgen *Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit* (GCLC) [Cortese-Krott *et al.*, 2009]. Der ebenfalls als aktiviert vorhergesagte Transkriptionsfaktor NFkB (siehe siehe Abschnitt 5.3.9 Seite 79 und Anhang) ist involviert in zelluläre Vorgänge, wie Differenzierung, Entzündung und Proliferation. Inaktives NFkB wird durch das inhibierende Protein IkB im Zytoplasma gehalten und durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Abbau von IkB freigegeben. NFkB hat im Intestinaltrakt eine protektive Rolle, als Reaktion auf akute Veränderungen, die Verletzungen und Entzündungen auslösen. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der normalen intestinalen Homöostase durch die Induktion von Cytokinen und antiapoptotischen Proteinen [Spehlmann und Eckmann, 2009].

Oxidativer Stress kann weiterhin zur Freisetzung von Zinkionen aus Proteinen führen, die Zinkfingermotive enthalten, wodurch die Funktion der Proteine behindert wird und die freien Ionen zelluläre Prozesse stören können [Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013]. Cortese-Krott *et al.* zeigen, dass Silberionen eine transiente intrazelluläre Zinkionenfreisetzung induzieren und das mRNA-Level von Zink-bindenden Proteinen, wie Metallothioneinen, durch die Aktivierung des *metal regulatory transcription factor 1* (MTF1) erhöhen [Cortese-Krott *et al.*, 2009]. Die Metallothioneine fungieren sowohl als Fänger für freie Radikale und freie Metallionen jeder Art, sind aber auch als Zinkspeicherprotein wichtig für die Aufrechterhaltung des Zinkstoffwechsels [Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013]. Metallothioneine spielen eine Rolle bei der Glutathionregeneration unter oxidativem Stress sowie dem Schutz der Mitochondrien und der Zelle vor Apoptose [Lindeque *et al.*, 2010]. In dieser Arbeit sind die Metallothioneine MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X und MT2A die am stärksten hochregulierten Gene sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array, insbesondere bei Konzentrationen von 10 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln (siehe Abschnitt 5.3.9, Seite 79). Auch Micro-Array Untersuchungen im M-Zell Modell, der Lungenepithelzelllinie A549 und der Makrophagenzelllinie U937 zeigen einen deutlichen Anstieg der Expression von Metallothioneinen [Bouwmeester *et al.*, 2011; Foldbjerg *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2012]. Insgesamt finden Bouwmeester *et al.* 19 regulierte Gene, die wichtig für die Bindung von Metallionen sind [Bouwmeester *et al.*, 2011]. Weiterhin wird die Regulation der Metallothioneine durch Silbernanopartikel und Silberionen auch in HepG2 Zellen und primären humanen Fibroblasten

gefunden [Kim *et al.*, 2009a; Cortese-Krott *et al.*, 2009]. Miyayama *et al.* zeigen, dass Silberionen, die in die Zelle eindringen, bis zu einer bestimmten Konzentration unter anderem von Metallothioneinen abgefangen werden. Zunehmende Konzentrationen an freien Ionen und die Freisetzung von Silberionen aus den Metallothioneinen durch Reaktion mit freien Radikalen ermöglicht es den freien Silberionen an andere Proteine zu binden und zelluläre Funktionen, wie die Atmungskette, zu stören [Miyayama *et al.*, 2013]. Zudem kann gezeigt werden, dass differenzierte Caco-2 Zellen Metallothioneine in das umgebende Medium abgeben [Moltedo, 2000]. Dies könnte einen zusätzlichen Schutz vor Silberionen bieten.

Die Aktivierung von AP1 erfolgt ebenfalls in Reaktion auf oxidativen Stress und bestimmte Metalle, aber auch andere Stimuli wie Zytokine und Wachstumsfaktoren [Valko *et al.*, 2006]. AP1 besteht aus einer Gruppe an Proteinen, von denen die Transkripte von *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B* (FOSB), *Fos-related antigen 1* (FOSL1), *cyclic AMP-dependent transcription factor* (ATF3) und *V-Jun Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene Homolog* (JUN) in dieser Arbeit und der von Bouwmeeser *et al.* reguliert sind [Bouwmeester *et al.*, 2011]. AP1 wird vor allem durch c-Jun N-terminale Kinase (JNK)- und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (P38-MAPK)-Signalwege aktiviert und kann positiv oder negativ die Zellproliferation und Apoptose beeinflussen, je nachdem welche Gene aktiviert werden [Valko *et al.*, 2006].

Unter den Stoffwechselwegen der IPA Analyse findet sich auch der P53 Stoffwechselweg (siehe siehe Abschnitt 5.3.9 Seite 79 und Anhang). Dieser Transkriptionsfaktor wird als Tumorsuppressor bezeichnet, weil er aufgrund von Zell- und DNA-Schäden den Zellzyklus anhält und gegebenenfalls Apoptose induziert [Valko *et al.*, 2006]. Ein Einfluss auf den Zellzyklus ist in den betroffenen Kategorien der Biofunktion und in den Stoffwechselwegen der Transkriptomanalyse zu finden (siehe siehe Abschnitt 5.3.9 Seite 79 und Anhang). Andere Arbeitsgruppen finden einen Einfluss von Silbernanopartikeln auf die Expression von p53 unter anderem in der humanen Epithelzelllinie A-431, den Embryonalstammzellen (mES) und embryonalen Fibroblasten (MEF) der Maus [Comfort *et al.*, 2011; Ahamed *et al.*, 2008]. Ein Einfluss von Silbernanopartikeln auf den Zellzyklus wird zum Beispiel in der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2, der humanen Jurkat T-Lymphozytenzelllinie sowie der humanen Lungenfibroblastzelllinie IMR-90 und der humanen Glioblastomzelllinie U251 gezeigt [Liu *et al.*, 2010b; Eom und Choi, 2010; AshaRani *et al.*, 2009].

Wie in Abbildung 41 dargestellt zeigt sich zusammenfassend, dass die Silbernanopartikel und Ionen vermutlich über die Wechselwirkung mit membranständigen Proteinen, aufgenommenen Ionen oder der Induktion von oxidativem Stress Einfluss auf die Calciumhomöostase und verschiedene Stoffwechselwege, der Kinasen FAK, ILK, ERK, MAPK sowie über Integrine, *Adherens Junction* und *Tight Junction* nehmen. Sie induzieren verschiedene Transkriptionsfaktoren und lösen somit eine zelluläre Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies,

Silberionen und Calciumeinstrom aus. Zudem sind Auswirkungen auf das Zytoskelett und die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Zellen zu beobachten. In Caco-2 Zellen kommt es schließlich zur Nekrose.

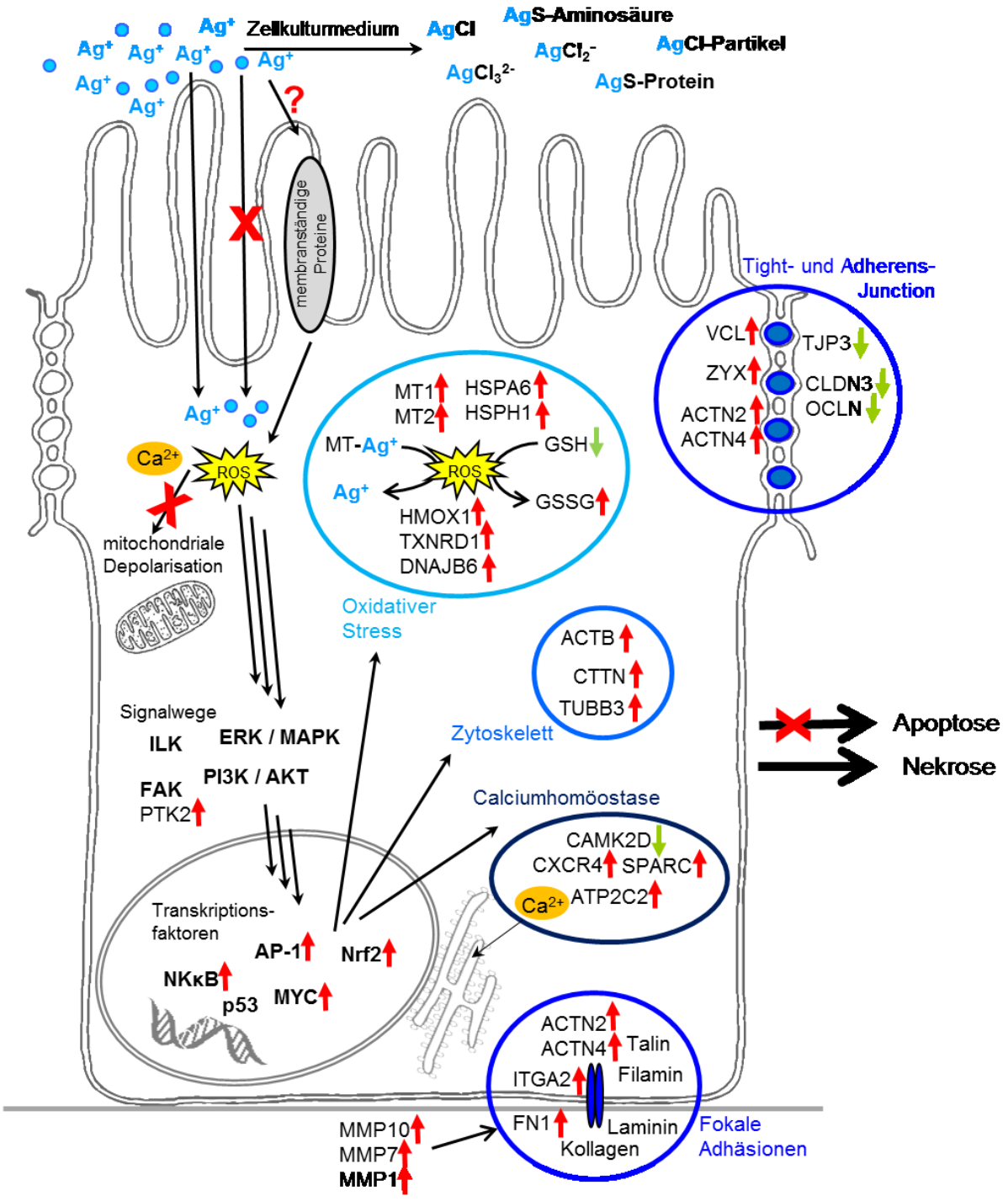

Abbildung 41: Übersicht über die Wechselwirkung und Wirkung von Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln mit differenzierten Caco-2 Zellen. Rote Pfeile kennzeichnen die Induktion und grüne Pfeile die Reduktion der Genexpression in der Transkriptomanalyse. Die vollständigen Genabkürzungen sind im Anhang zu finden. [Zellform von Ikonen, 2008]

7 Zusammenfassung

Die Nanotechnologie gilt vor allem in der Industrie als eine wichtige Zukunftstechnologie. Dabei ist darunter keine grundlegend neue Technologie zu verstehen. Vielmehr fasst sie eine Vielzahl von Technologien und wissenschaftlichen Teilbereichen zusammen, die in irgendeiner Weise mit Bausteinen und Materialien agieren, deren räumliche Abmessungen im unteren Nanometerbereich liegen. Die Anwendung von Nanomaterialien ist weit gefächert und erstreckt sich von der Elektronikbranche bis zum Lebensmittelsektor. Zu den Nanoobjekten zählen auch Nanopartikel, die in allen drei Dimensionen eine Ausdehnung von 1 bis 100 nm haben. Erste rechtliche Regelungen sowie Vorschläge zur exakten Definition gibt es erst seit wenigen Jahren.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine Stellungnahme der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA), die sich aufgrund fehlender Daten nicht in der Lage sah, die Bewertung von kolloidalem Silber als Nahrungsergänzungsmittel vorzunehmen. Als Grundlage für die Risikobewertung steht zunehmend die Aufnahme und Toxizität von Nanopartikeln im Fokus. Es hat sich bisher gezeigt, dass neben der chemischen Zusammensetzung die Größe der Partikel einen Einfluss auf deren Wirkung hat. Auch weitere Faktoren wie Form, Beschichtung und Ionenfreisetzung können eine Rolle spielen.

Nach oraler Gabe stellt der Darm die erst Barriere für die Aufnahme in den Körper dar. Zur genaueren Charakterisierung der Auswirkungen von Silbernanopartikel auf die gastrointestinale Barriere wurde in dieser Arbeit die Aufnahme über das humane Dünndarmepithel mittels eines etablierten *in vitro* Zellmodells, dem Caco-2-Zellmodell, und daraus resultierende molekulare Wirkmechanismen von Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln untersucht. Die Charakterisierung der Aufnahme der Tensid-beschichteten Silbernanopartikel erfolgte mittels Transwell®-Technik zur Untersuchung der Passage von Substanzen über den Dünndarmepithel-ähnlichen Caco-2 Zellmonolayer sowie elektronenmikroskopischer Bildgebung zur Betrachtung der zellulären Lokalisation. Um der *in vivo* Situation näherzukommen, wurde das System durch die Cokultur mit jeweils einer weiteren Zelllinie ergänzt, um zum einen die Mucusschicht und zum anderen die auf Partikelaufnahme spezialisierten M-Zellen zu modellieren. Es zeigte sich jedoch, dass die in dieser Arbeit untersuchten Silbernanopartikel in nicht zytotoxischen Konzentrationen das gastrointestinale Epithel nicht in größerer Menge passieren oder von den Epithelzellen aufgenommen werden.

Die beobachtete Zytotoxizität in höheren Nanopartikelkonzentrationen kann von mehreren Faktoren beeinflusst werden. Für deren Untersuchung wurde der CellTiter-Blue®-Cell Viability Assay, der die Stoffwechselaktivität der Zellen misst, mit anschließender DNA Färbung als Maß für die Zellzahl verwendet. Einen deutlichen Einfluss auf die Zytotoxizität zeigten die Silberionenfreisetzung und die Größe der Partikel. Ebenso kann die Zusammensetzung des Mediums Auswirkungen auf die Zytotoxizität haben, jedoch zeigte sich bei Tensid-beschichteten

Silbernanopartikeln nur ein geringer Einfluss. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Beschichtungen der Nanopartikel mit Tensiden, Tannin, PVP oder Peptiden auf die Zytotoxizität war aufgrund der vergleichbaren sterischen Stabilisierung nicht zu erkennen. Insgesamt deutete sich ein sehr komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Nanopartikel-, Assay- und Zelleigenschaften an.

Die Versuche zur Trennung der Einflüsse von partikulärer Form und freigesetzten Ionen mittels Ultrazentrifugation und Dialyse zeigten, dass die Silberionen eine entscheidende Rolle für die Wirkung von Silbernanopartikeln spielen. Jedoch konnte nicht endgültig zwischen Partikeln und Ionen unterschieden werden, da es sich um einen kontinuierlichen Prozess und in komplexen Lösungen um ein kompliziertes Wechselspiel zwischen den beiden Partnern handelt.

Zur Untersuchung des zellulären Wirkungsmechanismus der Tensid-beschichteten Silbernanopartikel wurden weiterhin Assays zur Messung des oxidativen Stresses, Glutathiongehaltes, Calciumeinstroms, der mitochondrialen Depolarisation und Impedanz sowie des Einflusses der Partikel auf das Transkriptom ausdifferenzierter Caco-2-Zellen mittels Micro-Array untersucht und die Regulation ausgewählter Gene anhand von PCR-Analysen verifiziert. Diese Analysen zeigten, dass die Wirkung von Silbernanopartikeln und Ionen auf Intestinalzellen vermutlich über die Wechselwirkung mit membranständigen Proteinen, über das Eindringen von Ionen in die Zellen und über oxidativen Stress vermittelt wurde. Diese nahmen Einfluss auf die Calciumhomöostase und verschiedene Stoffwechselwege, die unter anderem über die Fokalen Adhäsionen (*Focal Adhesion Kinase*, FAK), Integrine (*Integrin-linked kinase*, ILK) und Zell-Zell-Verbindungen (*Epithel Adherens Junction* und *Tight Junction Signaling*) vermittelt werden sowie Kinase-vermittelte Signalwege (*Extracellular signal-regulated kinases* / *Mitogen-activated protein kinases*, ERK / MAPK). Sie induzierten verschiedene Transkriptionsfaktoren und lösten somit eine zelluläre Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies und den Calciumeinstrom aus. Zudem waren Auswirkungen auf das Zytoskelett sowie die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Zellen zu beobachten. In Caco-2 Zellen kam es für höhere Konzentrationen schließlich zur Nekrose.

Für die Risikobewertung wird zum einen die tatsächliche Exposition des Menschen mit Silbernanopartikeln und zum anderen die Betrachtung der Eigenschaften und Auswirkungen dieser benötigt. Umfassende Daten zur Exposition liegen noch nicht vor, jedoch ist aufgrund der steigenden Verwendung von Silbernanopartikeln in Zukunft mit einem vermehrten Vorkommen zu rechnen. Die Betrachtung der Auswirkungen von Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln auf Intestinalzellen in dieser Arbeit zeigt, dass diese nicht aktiv aufgenommen werden. Trotzdem sind eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung sowie deutliche Auswirkungen auf den zellulären Stoffwechsel der Intestinalzellen zu erkennen. Die Ursachen der von einer Aufnahme unabhängigen molekularen Effekte auf das Dünndarmepithel bedürfen weiterer Untersuchungen.

8 Summary

In industry, nanotechnology is regarded as the technology of the future. Even though it is not a new technology, nanotechnology encompasses a variety of technologies and scientific fields, which all work with materials and components whose dimensions are in a nanometer size range. The applications of nanomaterials are highly diverse, ranging from the electrical engineering sector to the food industries. Nanoobjects also include nanoparticles, which range in size from 1 to 100 nm in all three dimensions. Legal regulations and proposals for an accurate definition have been in existence for several years.

The starting point for this work was a statement of the European Food and Safety Authority (EFSA), which pointed out that they are incapable of assessing the risk of colloidal silver supplements, due to a lack of data. The uptake and toxicity of nanomaterials is important as a basis for risk assessment. It has been shown that besides the chemical composition the size of the particles has an effect on the toxicity. Other factors like form, coating and ion release can also have an influence.

After oral administration the intestine is the first barrier for the resorption. For more precise characterization of the effects of silver nanoparticles on the gastrointestinal barrier, Caco-2, the well-established *in vitro* cell model for the human small intestinal epithelium, was used. Besides the investigation of the absorption mechanisms, the resulting molecular mechanisms are of interest. For the characterization of the uptake of surfactant coated silver nanoparticles the Transwell® technique was used when analyzing the passage of substances via the small intestinal like Caco-2 cell monolayer, as well as electron microscopy when picturing the cellular localization of the particles. To come closer to the *in vivo* situation, the *in vitro* system was complemented by two additional cell lines, mimicking the mucus layer as well as the microfold cells, which are specialized in particle uptake. It has been shown that the surfactant coated silver nanoparticles used do not pass the gastrointestinal epithelium in great quantities, when they are used in non-cytotoxic concentrations.

The observable cytotoxicity for higher concentrations of nanoparticles can be influenced by several factors. To investigate them the CellTiter-Blue®-Cell Viability Assay, for assessing the metabolic activity of cells, and a DNA staining, as a measurement for the cell number, were used. A clear influence on the cytotoxicity was detectable for the silver ion release rate and the particle size. The composition of the cell culture medium could also have an impact, which was minor for the surfactant coated silver nanoparticles. The influence of the different nanoparticle coatings, surfactant, tannic acid, PVP and peptides, was beyond recognition, due to the comparable steric effect of the coating molecules. Altogether, this suggests complex interactions of the different properties of nanoparticles, assays and cells.

The attempts to separate the influence of the silver particles from the released silver ions, by ultracentrifugation and dialysis, showed that the ions play an important role for the effect of the silver nanoparticles on cells. However it was not possible to definitely separate the effects of particles and ions, because the ion release of the particles is an ongoing process. Additionally, there is an extensive interplay between the particles and ions, especially in complex solutions like cell culture media.

To investigate the molecular mechanisms of the surfactant coated silver nanoparticles, different assays were used to measure the oxidative stress, glutathion content, calcium flux, mitochondrial depolarization and impedance of the cells. Also, the influence on the transcriptome of differentiated Caco-2 cells was analyzed by micro array technology and verified by PCR analysis. These examinations showed an effect of the silver nanoparticles and silver ions on the intestinal cells, which was probably mediated by proteins located in the cell membrane, the invasion on ions, or by oxidative stress. This exerted influence on the calcium homeostasis and different metabolic pathways like Focal Adhesion Kinase (FAK), Integrin Linked Kinase (ILK), Extracellular signal Regulated Kinases / Mitogen-Activated Protein Kinases (ERK / MAPK), Integrin, Epithel Adherens Junction und Tight Junction Signaling. Furthermore several transcription factors were induced, to respond to the reactive oxygen species and the calcium influx. There were also consequences for the cellular cytoskeleton as well as for the cell-cell contacts and cell-matrix contacts of the cells. High concentrations caused necrosis in Caco-2 cells.

For risk assessment is on the one hand the oral exposure of silver nanoparticles and on the other hand the consideration of toxicity nessesary. Complete exposition data are not available, but the applications of silver nanoparticles are rising and so will the exposition. The data of this PhD thesis showed that surfactant coated silver nanoparticles are not actively taken up by intestinal cells. Although a clear influence on the metabolic activity and pathways were detectable. Nevertheless, the effect of silver nanoparticles on intestinal cells requires further study.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. **Alfonso Lampen** dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe, meine hier vorliegende Dissertation am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zu einem sehr interessanten Forschungsgebiet ausarbeiten zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. **Lothar W. Kroh** bedanken, der ohne Zögern die Betreuung an der Technischen Universität Berlin übernommen hat.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. **Birgit Niemann** für die intensive und freundschaftliche Betreuung und Förderung meiner Arbeit sowie die fachliche und moralische Unterstützung.

Da die toxikologische Arbeit mit Nanopartikeln nicht ohne eine umfangreiche Charakterisierung sowie begleitende Analytik der Partikel möglich gewesen wäre, möchte ich den Kooperationspartnern von der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM), Prof. Dr. **Andreas Thünemann** und vor allem den Doktoranden Dr. **Patrick Knappe**, **Matthias Girod** und **Ulf Hansen,** mit denen ich eng zusammenarbeiten durfte, danken. Sie haben wesentlich zur Ermöglichung dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich der gesamten labortechnischen Arbeitsgruppe der Abteilung 5 – Lebensmittelsicherheit des BfR. Namentlich erwähnt seien dabei für ihre theoretische und praktische Hilfe und ihre Tipps **Stefanie Klenow**, Dr. **Stefanie Hessel**, Dr. **Anke Ehlers** und Dr. **Thorsten Buhrke**, für die tatkräftige Unterstützung **Anja Kölner** und **Linda Brandenburger** und für den fachlichen Austausch, die Ablenkung und gute Arbeitsatmosphäre **Sabrina Gabriel**, **Christin Beubler**, **Anja Kibellus**, **Claudia Luckert**, **Marianne Klötzel**, **Eileen Scharmach**, **Sandra Stempin**, **Beatrice Rosskopp** und PD Dr. **Diana Rubin**. Besonderer Dank gilt meinen fleißigen Masteranden und Diplomanden **Jessica Runkewitz**, **Thomas Harwardt**, **Nina Hahne**, **Gesine Herber** und **Christin Langanke** und den beiden Doktoranden **Dajana Lichtenstein** und **Sabine Horzowski**, an die ich meine Erfahrungen und Arbeit übergeben durfte und die mir am Ende meiner Arbeit nochmals sehr geholfen haben.

Dank für die fachliche und kooperative Unterstützung gilt Dr. **Frank Henkler** in Sachen Fluoreszenzmarkierung und Konfokalem Mikroskop, **Manuel Hitzler** und Dr. **Matthias Peiser** bei der Verwendung des FACS, **Monika Sachtleben** aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. **Johanna Plendl** an der FU für die Probenpräparation und TEM-Bilder, **Hedwig Lammert** aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. **Michael Hummel** an der Charité für die Micro-Arrays, Dr. **Stefan Weigel** von RIKILT für die Informationen zur Mikrowelle und **Anja Fromm** aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. **Jörg-Dieter Schulzke** für die Erklärung der HT-29/B6 Zellen.

Besonders möchte ich mich bei meiner Freundin **Cindy Kochan** bedanken, die mich vor allem mit ihrem Fachwissen und ermunternden Worten unterstützt hat. Großer Dank gilt meinem Freund **Sebastian Schreiber** für seine Liebe und den Rückhalt, den er mir gegeben hat. Bei meiner **Familie** bedanke ich mich dafür, dass sie mich ohne Zweifel auf meinem Weg bis hierher unterstützt und begleitet hat. Und um es nicht zu vergessen bedanke ich mich bei der **Da Sheng Men Kung Fu** Gruppe und meinem Sifu **Thomas Quehl** für die Ablenkung und das Training, auch wenn ich es am Ende sehr vernachlässigt habe.

… ohne diese große Unterstützung wäre diese Arbeit nicht entstanden, ich hoffe ich habe niemanden vergessen … **DANKE !**

Literaturverzeichnis

AAT Bioquest. **2010.** Screen Quest™ Fluo-8 Medium Removal Calcium Assay Kit. Product Technical Information Sheet.

AAT Bioquest. **2012.** Cell Meter™ JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay. Product Technical Information Sheet.

Abassi YA, Xi B, Zhang W, Ye P, Kirstein SL, Gaylord MR, Feinstein SC, Wang X und Xu X. **2009.** Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. *Chemistry & Biology* Vol. 16: No. 7: 712–723.

aceabio.com. **2013**. verfügbar unter: http://www.aceabio.com/theory.aspx. zuletzt geprüft am 05.02.2013.

Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ und Hong Y. **2008.** DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* Vol. 15: No. 233: 404–410.

Ahamed M, AlSalhi MS und Siddiqui MKJ. **2010.** Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta.* Vol. 14: No. 411: 1841–1848.

Alfadda AA und Sallam RM. **2012.** Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Vol. 2012: No. 1: 1–14.

Almofti MR, Ichikawa T, Yamashita K, Terada H und Shinohara Y. **2003.** Silver Ion Induces a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria and Release of Apoptogenic Cytochrome c. *J. Biochem.* Vol. 134: No. 1: 43–49.

Application Note. **2013.** xCELLigence System RTCA HT Instrument Long-Term High-Throughput Cytotoxicity Profiling. No. 14.

Armitage SA, White MA und Wilson HK. **1996.** The determination of silver in whole blood and its application to biological monitoring of occupationally exposed groups. *Ann Occup Hyg.* Vol. 40: No. 3: 331–338.

Artursson P. **1990.** Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorbtive (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 79: No. 6: 476–482.

Artursson P und Karlsson J. **1991.** Correlation Between Oral Drug Absorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol. 175: No. 3: 880–885.

AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP und Valiyaveettil S. **2009.** Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* Vol. 3: No. 2: 279–290.

Attwell S, Roskelley C und Dedhar S. **2000.** The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* Vol. 19: No. 33: 3811–3815.

Badawy AME, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT und Tolaymat TM. **2010.** Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environmental Science & Technology* Vol. 44: No. 4: 1260–1266.

BAM. **2013.** Certified Reference Material BAM-N001. Particle Size Parameters of Nano Silver.

Barbehenn RV und Constabel CP. **2011.** Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry* Vol. 72: No. 13: 1551–1565.

Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS und Autrup H. **2012.** Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters* Vol. 208: No. 3: 286–292.

Behrens I, Pena AIV, Alonso MJ und Kiessel T. **2002.** Comparative Uptake Studies of Bioadhesive and Non-Bioadhesive Nanoparticles in Human Intestinal Cell Lines and Rats: The Effect of Mucus on Particle Adsorption and Transport. *Pharmaceutical Research* Vol. 19: No. 8: 1185–1193.

Behrens I und Kissel T. **2003.** Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? *European Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 19: No. 5: 433–442.

Beltrami D, Calestani D, Maffini M, Suman M, Melegari B, Zappettini A, Zanotti L, Casellato U, Careri M und Mangia A. **2011.** Development of a combined SEM and ICP-MS approach for the qualitative and quantitative analyses of metal microparticles and sub-microparticles in food products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Vol. 401: No. 4: 1401–1409.

Berridge MJ, Bootman MD und Roderick HL. **2003.** Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol. 4: No. 7: 517–529.

BfR. **2010.** Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) rät von Nanosilber in Lebensmitteln und Produkten des täglichen Bedarfs ab. Nr. 024/2010.

BfR. **2012.** Nanomaterialien: Sondergutachten des Sachverständigenrats für Umweltfragen bestätigt BfR-Einschätzung. Nr. 013/2012.

Boese K. **1921.** Über Collargol, seine Anwendung und seine Erfolge in der Chirurgie und Gynäkologie. *Dtsch. Z. Chir.* Vol. 163: No. 1: 62–84.

Böhmert L, Niemann B, Thünemann AF und Lampen A. **2012.** Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Archives of Toxicology* Vol. 86: No. 7: 1107–1115.

Böhmert L, Girod M, Hansen U, Maul R, Knappe P, Niemann B, Weidner S, Thünemann AF und Lampen A. **2013.** Analytically Monitored Digestion of Silver Nanoparticles and their Toxicity for Human Intestinal Cells. *Nanotoxicology* Vol. 42: No. 23: 8959–8964.

Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D und Oberdorster E. **2006.** The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* Vol. 3: No. 1: 1–35.

Bouchard V, Demers M, Thibodeau S, Laquerre V, Fujita N, Tsuruo T, Beaulieu J, Gauthier R, Vezina A, Villeneuve L und Vachon PH. **2007.** Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *Journal of cellular physiology* Vol. 212: No. 3: 717–728.

Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam MY, Hagens WI, Bulder AS, Heer C de, Voorde SE ten, Wijnhoven SW, Marvin HJ und Sips AJ. **2009.** Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* Vol. 53: No. 1: 52–62.

Bouwmeester H, Poortman J, Peters RJ, Kramer E, Makama S, Puspitaninganindita K, Marvin HJP, Peijnenburg AACM und Hendriksen PJM. **2011.** Charakterisation of Translocation of Silver Nanoparticles and Effects on Whole-Genome Gene Expression Using an In Vitro Intestinal Epithelium Coculture Model. *ACS Nano* Vol. 5: No. 5: 4091–4103.

britannica.com. **2013**. verfügbar unter: http://www.britannica.com/. zuletzt geprüft am 05.04.2013.

Buettner KM, Rinciog CI und Mylon SE. **2010.** Aggregation kinetics of cerium oxide nanoparticles in monovalent and divalent electrolytes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* Vol. 366: 1-3: 74–79.

BUND. **2008.** Aus dem Labor auf den Teller. Die Nutzung der Nanotechnologie im Lebensmittelsektor.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess K, Jones R und Schlager JJ. **2008.** Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Physical Chemistry B* Vol. 112: No. 43: 13608–13619.

Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ und Puntes VF. **2011.** Hardening of the Nanoparticle-Protein Corona in Metal (Au, Ag) and Oxide (Fe3O4, CoO, and CeO2) Nanoparticles. *Small* Vol. 7: No. 24: 3479–3486.

Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA und Linse S. **2007.** Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 104: No. 7: 2050–2055.

Cha K, Hong H, Choi Y, Lee MJ, Park JH, Chae GR und Myung H. **2008.** Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnology Letters* Vol. 30: No. 11: 1893–1899.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG und Zweibaum Alain. **1988.** Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines1 Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Different Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines. *Cancer Research* Vol. 48: No. 1: 1936–1942.

Chen X, Elisia I und Kitts DD. **2010.** Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* Vol. 61: No. 3: 334–342.

Chernousova S und Epple M. **2013.** Silber als antibakterielles Agens: Ion, Nanopartikel, Metall. *Angewandte Chemie* Vol. 125: No. 6: 1678–1696.

Chiarugi P und Giannoni E. **2008.** Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Special Issue: Apoptosis World 2008* Vol. 76: No. 11: 1352–1364.

Chithrani BD, Ghazani AA und Chan WCW. **2006.** Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* Vol. 6: No. 4: 662–668.

COM/2012/0572. Mitteilung der Kommission an das Europäische Parlament, den Rat und den Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschuss - Zweite Überprüfung der Rechtsvorschriften zu Nanomaterialien 03.10.2012 bisher nicht geändert (Stand 11.07.2013).

Comfort KK, Maurer EI, Braydich-Stolle LK und Hussain SM. **2011.** Interference of Silver, Gold, and Iron Oxide Nanoparticles on Epidermal Growth Factor Signal Transduction in Epithelial Cells. *ACS Nano* Vol. 5: No. 12: 10000–10008.

Cortese-Krott MM, Münchow M, Pirev E, Heβner F, Bozkurt A, Uciechowski P, Pallua N, Kröncke K und Suschek CV. **2009.** Silver ions induce oxidative stress and intracellular zinc release in human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* Vol. 47: No. 11: 1570–1577.

Dart CLMLBRSPASPJCECSMJSPR. **1998.** The dependence of Ag+ block of a potassium channel, murine Kir2.1, on a cysteine residue in the selectivity filter. *J Physiol.* Vol. 511: No. 1: 15–24.

DECHEMA VCI. **2011.** 10 Jahre Forschung zu Risikobewertung, Human- und Ökotoxikologie von Nanomaterialien. Statuspapier des DECHEMA/VCI-Arbeitskreises „Responsible Production and Use of Nanomaterials".

Deng F, Olesen P, Foldbjerg R, Dang DA, Guo X und Autrup H. **2010.** Silver nanoparticles up-regulate Connexin43 expression and increase gap junctional intercellular communication in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Nanotoxicology* Vol. 4: No. 2: 186–195.

Des Rieux A, Fievez V, Théate I, Mast J, Préat V und Schneider Y. **2007.** An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 30: No. 5: 380–391.

Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL und Levy RJ. **1996.** Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size. *Pharmaceutical Research* Vol. 13: No. 12: 1838–1845.

Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ und Amidon GL. **1997.** The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent. *Pharmaceutical Research* Vol. 14: No. 11: 1568–1573.

DIN CEN ISO/TS 27687. **2008.** Nanotechnologien – Terminologie und Begriffe für Nanoobjekte – Nanopartikel, Nanofaser und Nanoplättchen. Deutsche Fassung.

Dorak TM. **2007.** Real-time PCR. Advaced Methodes, *Taylor & Francis New York*. ISBN 0-203-96731-3.

Drake PL und Hazelwood KJ. **2005.** Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. *Annals of Occupational Hygiene* Vol. 49: No. 7: 575–585.

dreluso.de. **2013**. verfügbar unter: http://www.dreluso.de/index.php?lg=de&main=Verdauung_und_S&site=03:01:02&id=192. zuletzt geprüft am 16.02.2013.

Drescher D, Orts-Gil G, Laube G, Natte K, Veh RW, Österle W und Kneipp J. **2011.** Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Vol. 400: No. 5: 1367–1373.

Duncan TV. **2011.** Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science* Vol. 363: No. 1: 1–24.

EFSA. **2008.** Inability to assess the safety of a silver hydrosol added for nutritional purposes as a source of silver in food supplements and the bioavailability of 1 as a source of silver in food supplements and the bioava silver from this source based on the supporting dossier. Question No EFSA-Q-2005-169.

EFSA. **2009.** The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety. Scientific Opinion of the Scientific Committee (Question No EFSA-Q-2007-124a).

EFSA. **2011.** Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. Scientific Opinion of the Scientific Committee.

Elder A, Vidyasagar S und DeLouise L. **2009.** Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* Vol. 1: No. 4: 434–450.

Empfehlung 2011/696/EU. Empfehlung der Kommission (2011/696/EU) zur Definition von Nanomaterialien vom 18.10.2011 zuletzt geändert durch Berichtigung der Empfehlung 2011/696/EU (ABl. L 9 vom 15.1.2013, S. 14–14). *ABl. L 275 vom 20.10.2011, S. 38–40.*

Engbers-Buijtenhuijs P, Kamphuis M, Sluijs Veer G, Haanen C, Poot AA, Feijen J und Vermes I. **2005.** A novel time resolved fluorometric assay of anoikis using Europium-labelled Annexin V in cultured adherent cells. *Apoptosis* Vol. 10: No. 2: 429-437.

Eom H und Choi J. **2010.** p38 MAPK Activation, DNA Damage, Cell Cycle Arrest and Apoptosis As Mechanisms of Toxicity of Silver Nanoparticles in Jurkat T Cells. *Environmental Science & Technology* Vol. 44: No. 21: 8337–8342.

Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ und Hardcastle JD. **1988.** Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* Vol. 29: No. 8: 1035–1041.

Fadda H, McConnell E, Short M und Basit A. **2009.** Meal-Induced Acceleration of Tablet Transit Through the Human Small Intestine. *Pharmaceutical Research* Vol. 26: No. 2: 356-360.

fairvital.com. **2013**. verfügbar unter: http://www.fairvital.com/product_info.php?products_id=77. zuletzt geprüft am 11.07.2013.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN und Kim J. **2000.** A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J Biomed Mater Res.* Vol. 52: No. 5: 662–668.

Florence AT. **1997.** The Oral Absorption of Micro- and Nanoparticulates: Neither Exceptional Nor Unusual. *Pharmaceutical Research* Vol. 14: No. 3: 259–266.

Fogh J, Fogh JM und Orfeo T. **1977.** One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumores in Nude Mice. *J Natl Cancer Inst* Vol. 59: No. 1: 221–226.

Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ und Autrup H. **2009.** PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters* Vol. 190: No. 2: 156–162.

Foldbjerg R, Dang DA und Autrup H. **2011.** Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology* Vol. 85: No. 7: 743–750.

Foldbjerg R, Irving ES, Hayashi Y, Sutherland DS, Thorsen K, Autrup H und Beer C. **2012.** Global Gene Expression Profiling of Human Lung Epithelial Cells After Exposure to Nanosilver. *Toxicological Sciences* Vol. 130: No. 1: 145–157.

Frens G und Overbeek JTG. **1969.** Carey Lea's colloidal silver. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* Vol. 233: 1-2: 922–929.

Frewer LJ, Norde W, Fischer A und Kampers F. **2011.** Nanotechnology in the Agri-Food Sector. Implications for the Future, *John Wiley Germany*. ISBN 978-3527330607.

Frisch SM und Francis H. **1994.** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology* Vol. 124: No. 4: 619–626.

Fung MC und Bowen DL. **1996.** Silver Products for Medical Indications: Risk-Benefit Assessment. *Clinical Toxicology* Vol. 34: No. 1: 119–126.

Gaiser BK, Fernandes TF, Jepson MA, Lead JR, Tyler CR, Baalousha M, Biswas A, Britton GJ, Cole PA, Johnston BD, Ju-Nam Y, Rosenkranz P, Scown TM und Stone V. **2012.** Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 31: No. 1: 144–154.

Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, Haberl N, Brunelli A, Kreyling WG und Stone V. **2013.** Effects of Silver Nanoparticles on the Liver and Hepatocytes In Vitro. *Toxicological Sciences* Vol. 131: No. 2: 537–547.

Galluzzi LVI, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M, Dawson TM, Dawson VJ, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G und Kroemer G. **2012.** Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* Vol. 19: No. 1: 107–120.

García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA und Mendieta-Zeron H. **2011.** Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International Dental Journal* Vol. 61: No. 6: 297–301.

Gärtner J. **2002.** Etablierung eines Zellkultur-Modells für M-Zellen und vergleichende molekulare Analyse der LEE-Pathogenitätsinsel atypischer enteropathogener Escherichia coli. *Promotion, Universität Münster (Westfalen)*.

Gatti AM, Tossini D, Gambarelli A, Montanari S und Capitani F. **2008.** Investigation of the Presence of Inorganic Micro- and Nanosized Contaminants in Bread and Biscuits by Environmental Scanning Electron Microscopy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Vol. 49: No. 3: 275–282.

Giannone G. **2002.** Calcium Oscillations Trigger Focal Adhesion Disassembly in Human U87 Astrocytoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 277: No. 29: 26364–26371.

Glover RD, Miller JM und Hutchison JE. **2011.** Generation of Metal Nanoparticles from Silver and Copper Objects: Nanoparticle Dynamics on Surfaces and Potential Sources of Nanoparticles in the Environment. *ACS Nano* Vol. 5: No. 11: 8950–8957.

Gomes A, Fernandes E und Lima JLFC. **2005.** Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* Vol. 65: 2-3: 45–80.

Gopinath P, Gogoi SK, Sanpui P, Paul A, Chattopadhyay A und Ghosh SS. **2010.** Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. Vol. 77: No. 2: 240–245.

Gould GW, Colyer J, East JM und Lee AG. **1987.** Silver Ions Trigger Ca2+ Release by Interaction with the (Ca2+-Mg2+)-ATPase in Reconstituted Systems. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 262: No. 16: 7676–7679.

Graf P, Mantion A, Foelske A, Shkilnyy A, Mašić A, Thünemann AF und Taubert A. **2009.** Peptide-Coated Silver Nanoparticles: Synthesis, Surface Chemistry, and pH-Triggered, Reversible Assembly into Particle Assemblies. *Chemistry - A European Journal* Vol. 15: No. 23: 5831–5844.

Greulich C, Diendorf J, Geßmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler G, Schildhauer T, Epple M und Köller M. **2011.** Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomaterialia* Vol. 7: No. 9: 3505–3514.

Gromová P, kurejová M und Lacinová L. **2003.** Inhibition of Cav3.1 Channel by Silver Ions. *Gen. Physiol. Biophys.* Vol. 22: No. 4: 515–523.

Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, Baird AW und Artursson P. **2000.** Expression of Specific Markers and Particle Transport in a New Human Intestinal M-Cell Model. *Biochemical and Biophysical Resurch Communications* Vol. 279: No. 3: 808–813.

Gupta A und Lutsenko S. **2009.** Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future medicinal chemistry* Vol. 1: No. 6: 1125–1142.

Haase A, Arlinghaus HF, Tentschert J, Jungnickel H, Graf P, Mantion A, Draude F, Galla S, Plendl J, Goetz ME, Masic A, Meier W, Thünemann AF, Taubert A und Luch A. **2011.** Application of Laser Postionization Secondary Neutral Mass Spectrometry/Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry in Nanotoxicology: Visualization of Nanosilver in Human Macrophages and Cellular Responses. *ACS Nano* Vol. 5: No. 4: 3059–3068.

Haase A, Mantion A, Graf P, Plendl J, Thuenemann AF, Meier W, Taubert A und Luch A. **2012a.** A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems. *Archives of Toxicology* Vol. 86: No. 7: 1089–1098.

Haase A, Rott S, Mantion A, Graf P, Plendl J, Thünemann AF, Meier WP, Taubert A, Luch A und Reiser G. **2012b.** Effects of Silver Nanoparticles on Primary Mixed Neural Cell Cultures: Uptake, Oxidative Stress and Acute Calcium Responses. *Toxicological Sciences* Vol. 126: No. 2: 457–468.

Hailer S. **2010.** Nanomedizin - Chance und Herausforderung. *Dtsch med Wochenschr* Vol. 135: No. 20: 1004–1006.

Hamilton EI und Minski MJ. **1973.** Abundance of the chemical elements in man's diet and possible relations with environmental factors. *The Science of the Total Environment,* Vol. 1: No. 4: 375–394.

Hassellöv M, Readman JW, Ranville JF und Tiede K. **2008.** Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* Vol. 17: No. 5: 344–361.

Hatse S, Princen K, Bridger G, Clercq E de und Schols D. **2002.** Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Letters* Vol. 11: No. 527: 255–262.

Hendren CO, Mesnard X, Dröge J und Wiesner MR. **2011.** Estimating Production Data for Five Engineered Nanomaterials As a Basis for Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology* Vol. 45: No. 7: 2562–2569.

Hensel A, Rischer M, Di Stefano D, Behr I und Wolf-Heuss E. **1997.** Full chromatographic characterization of nonionic surfactant polyoxyethylene glycerol trioleate. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* Vol. 72: No. 3: 185–189.

Hessel S. **2010.** Mechanismen zur Detoxifizierung von Benzo(a)pyren-Metaboliten in der gastrointestinalen Barriere. *Promotion, Universität Potsdam.*

Hidalgo IJ, Raub TJ und Borchardt RT. **1989.** Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* Vol. 96: No. 3: 736–749.

Hillyer JF und Albrecht RM. **2001.** Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 90: No. 12: 1927–1936.

histonet2000.de. **2013**. verfügbar unter: http://www.histonet2000.de/praeparat.php?pzid=012_020#. zuletzt geprüft am 16.02.2013.

Holt KB und Bard AJ. **2005.** Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of Escherichia coli. *Biochemistry* Vol. 44: No. 39: 13214–13223.

Honore S, Pichard V, Penel C, Rigot V, Prev t C, Marvaldi J, Briand C und Rognoni JB. **2000.** Outside-in regulation of integrin clustering processes by ECM components per se and their involvement in actin cytoskeleton organization in a colon adenocarcinoma cell line. *Histochemistry and cell biology* Vol. 114: No. 4: 323–335.

Huang Y, Chen S, Bing X, Gao C, Wang T und Yuan B. **2011.** Nanosilver Migrated into Food-Simulating Solutions from Commercially Available Food Fresh Containers. *Packaging Technology and Science* Vol. 24: No. 5: 291–297.

Hubatsch I, Ragnarsson EGE und Artursson P. **2007.** Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols* Vol. 2: No. 9: 2111–2119.

Huyghebaert A, van Huffel X and Houins G. **2010.** International symposium: Nanotechnology in the food chain. Opportunitys & Risks.

Ikonen E. **2008.** Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol. 9: No. 2: 125–138.

ingenuity.com. **2013**. verfügbar unter: http://www.ingenuity.com/products/ipa#/?tab=overview. zuletzt geprüft am 10.07.2013.

Jahn MR, Nawroth T, Fütterer S, Wolfrum U, Kolb U und Langguth P. **2012.** Iron Oxide/Hydroxide Nanoparticles with Negatively Charged Shells Show Increased Uptake in Caco-2 Cells. *Molecular Pharmaceutics* Vol. 9: No. 6: 1628–1637.

Kang M, Kobayashi A, Nobunao W, Kim S und Yamamoto M. **2004.** Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Vol. 101: No. 7: 2046–2051.

Kang SJ, Lee YJ, Lee E und Kwak M. **2012a.** Silver nanoparticles-mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling. *Toxicology Letters* Vol. 211: No. 3: 334–341.

Kang SJ, Ryoo I, Lee YJ und Kwak M. **2012b.** Role of the Nrf2-heme oxygenase-1 pathway in silver nanoparticle-mediated cytotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* Vol. 258: No. 1: 89–98.

Kapuscinski J und Skoczylas B. **1978.** Fluorescent complexes of DNA with DAPI 4',6-diamidine-2-phenyl indole.2HCI or DCI 4',6-dicarboxyamide-2-phenyl indole. *Nucleic Acids Resurch* Vol. 5: No. 10: 3775–3799.

Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J und Möller L. **2008.** Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chemical Research in Toxicology* Vol. 21: No. 9: 1726–1732.

Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P und Möller L. **2009.** Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters* Vol. 188: No. 2: 112–118.

Kawata K, Osawa M und Okabe S. **2009.** In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells. *Environmental Science & Technology* Vol. 43: No. 15: 6046–6051.

Kermanizadeh A, Gaiser BK, Ward MB und Stone V. **2012a.** Primary human hepatocytes versus hepatic cell line: assessing their suitability for in vitro nanotoxicology. *Nanotoxicology* online veröffentlicht: 1–17.

Kermanizadeh A, Gaiser BK, Hutchison GR und Stone V. **2012b.** An in vitro liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology* Vol. 9: No. 28: 1–13.

Kernéis SBA, Kraehenbuhl J und Pringault E. **1997.** Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into M Cells that nversion by Peyer's Patch Lymphocyte Human Enterocytes into M Cells that Transport Bacteria Enterocytes into M C Transport Bacteria. *Science* Vol. 277: No. 5328: 949–952.

Kernéis S, Caliot E, Stubbe H, Bogdanova A, Kraehenbuhl J und Pringault E. **2000.** Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update. *Microbes and Infection* Vol. 2: No. 9: 1119–1124.

Khossravi M, Kao Y, Mrsny RJ und Sweeney TD. **2002.** Analysis Methods of Polysorbate 20: A New Method to Assess the Stability of Polysorbate 20 and Established Methods That May Overlook Degraded Polysorbate 20. *Pharmaceutical Research* Vol. 19: No. 5: 634–639.

Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, Choi BS, Lim R, Chang HK, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS und Yu IJ. **2008.** Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhalation Toxicology* Vol. 20: No. 6: 575–583.

Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K, Park K, Yi J und Ryu D. **2009a.** Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro* Vol. 23: No. 6: 1076–1084.

Kim W, Kim J, Park JD, Ryu HY und Yu IJ. **2009b.** Histological Study of Gender Differences in Accumulation of Silver Nanoparticles in Kidneys of Fischer 344 Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* Vol. 72: 21-22: 1279–1284.

Kim Y, Suh HS, Cha HJ, Kim SH, Jeong KS und Kim DH. **2009c.** A case of generalized argyria after ingestion of colloidal silver solution. *Am J Ind Med.* Vol. 52: No. 3: 246–250.

Kim E, Chu YC, Han JY, Lee DH, Kim YJ, Kim H, Lee SG, Lee SJ, Jeong SW und Kim JM. **2010a.** Proteomic analysis of silver nanoparticle toxicity in rat. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* Vol. 2: No. 4: 251–262.

Kim YS, Song MY, Park KS, Ryu HR, Chung YH, Chang HK, Lee JH, Oh KH, Kelman BJ, Hwang K in und Yu IJ. **2010b.** Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* Vol. 7: No. 20: 1–11.

Kim S und Ryu D. **2013.** Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology* Vol. 33: No. 2: 78–89.

Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu S und Dejean LM. **2011.** Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochimica et biophysica acta* Vol. 1813: No. 4: 616–622.

Kittler S, Greulich C, Diendorf J, Köller M und Epple M. **2010a.** Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chem. Mater* Vol. 22: No. 16: 4548–4554.

Kittler S, Greulich C, Gebauer JS, Diendorf J, Treuel L, Ruiz L, Gonzalez-Calbet JM, Vallet-Regi M, Zellner R, Koller M und Epple M. **2010b.** The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *J. Mater. Chem* Vol. 20: No. 3: 512–518.

Klein C, Comero S, Stahlmecke B, Romazanov J, Kuhlbusch T, van Doren E, Temmerman P de, Mast J, Wick P, Krug H, Locoro G, Hund-Rinke K, Kördel W, Friedrichs S, Maier G, Werner J, Linsinger T and Gawlik B. **2011.** NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials NM-300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity. European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection.

Kleist S von, Chany E, Burtin P, King M und Fogh J… **1975.** Immunohistology of the Antigenic Pattern of a Continuous Cell Line From a Human Colon Tumor. *Journal of the national cancer institute* Vol. 55: No. 5: 555–560.

Klenow S, Pool-Zobel BL und Glei M. **2009.** Influence of inorganic and organic iron compounds on parameters of cell growth and survival in human colon cells. *Toxicology in Vitro* Vol. 23: No. 3: 400–407.

Kokoska ER, Smith GS, Deshpande Y, Rieckenberg CL und Miller TA. **1998.** Adaptive Cytoprotection Induced by Ethanol in Human Intestinal Cells Adaptive Cytoprotectio Human Intestinal Cells. *Annals of Surgery Vol. 228, No. 1, 123-130* Vol. 228: No. 1: 123–130.

KOM/2008/0366. Mitteilung der Kommission an das Europäische Parlament, den Rat und den Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschuss - Regelungsaspekte bei Nanomaterialien 17.06.2008 bisher nicht geändert (Stand 12.07.2013).

Konsoula R und Barile FA. **2005.** Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro* Vol. 19: No. 5: 675–684.

Kreusel K, Fromm M, Schulzke J und Hegel U. **1991.** Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol.* Vol. 261: No. 1: C574-582.

Kühni W und Holst W von. **2008.** Kolloidales Silber als Medizin. Das gesunde Antibiotikum, *AT Verlag Aarau.* ISBN 978-3038003557.

Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Prucek R, Holecova M und Zboril R. **2008.** Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *Journal of Physical Chemistry C* Vol. 112: No. 15: 5825–5834.

Lampen A, Ebert B, Stumkat L, Jacob J und Seidel A. **2004.** Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC-transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human Caco-2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* Vol. 1681: No. 1: 38–46.

Lansdown ABG. **2007.** Critical Observations on the Neurotoxicity of Silver. *Critical Reviews in Toxicology* Vol. 37: No. 3: 237–250.

Lee YS, Kim DW, Lee YH, Oh JH, Yoon S, Choi MS, Lee SK, Kim JW, Lee K und Song C. **2011.** Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKCζ-dependent signaling in A549 lung cells. *Archives of Toxicology* Vol. 85: No. 12: 1529–1540.

Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil K und Park K. **2012.** Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* online veröffentlicht: 1–11.

Lemasters JJ, Nieminen A, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Casicio WE, Bradham CA, Brenner DA und Herman B. **1998.** The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* Vol. 1366: 1-2: 177–196.

Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z und Nieminen AL. **2009.** Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1787: No. 11: 1395–1401.

Lemieux B, Aharoni A und Schena M. **1998.** Overview of DNA chip technology. *Molecular Breeding* Vol. 4: No. 4: 277–289.

Lesniak A, Campbell A, Monopoli MP, Lynch I, Salvati A und Dawson KA. **2010.** Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* Vol. 31: No. 36: 9511–9518.

Li W, Xie X, Shi Q, Zeng H, OU-Yang Y und Chen Y. **2010.** Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 85: No. 4: 1115–1122.

Li X, Lenhart JJ und Walker HW. **2012.** Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles. *Langmuir* Vol. 28: No. 2: 1095–1104.

Lim D, Jang J, Kim S, Kang T, Lee K und Choi I. **2012.** The effects of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on inflammatory and stress genes in human macrophages using cDNA microarray analysis. *Biomaterials* Vol. 33: No. 18: 4690–4699.

Lin I, Liang M, Liu T, Monteiro MJ und Toth I. **2012a.** Cellular transport pathways of polymer coated gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* Vol. 8: No. 1: 8–11.

Lin J, Lin W, Dong R und Hsu S. **2012b.** The cellular responses and antibacterial activities of silver nanoparticles stabilized by different polymers. *Nanotechnology* Vol. 23: No. 6: 65102.

Lindeque JZ, Levanets O, Louw R und van der Westhuizen FH. **2010.** The Involvement of Metallothioneins in Mitochondrial Function and Disease. *Current Protein and Peptide Science* Vol. 11: No. 4: 292–309.

Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue W, Lynch I, Lindman S, Thulin E, Radford SE und Dawson KA. **2007.** Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 104: No. 21: 8691–8696.

Liu J und Hurt RH. **2010.** Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environmental Science & Technology* Vol. 44: No. 6: 2169–2175.

Liu J, Sonshine DA, Shervani S und Hurt RH. **2010a.** Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano* Vol. 4: No. 10: 6903–6913.

Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, Cui L, Zhou QF, Yan B und Jiang GB. **2010b.** Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* Vol. 4: No. 3: 319–330.

Liu J, Wang Z, Liu FD, Kane AB und Hurt RH. **2012.** Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. *ACS Nano* Vol. 6: No. 11: 9887–9899.

Lo D, Tynan W, Dickerson J, Scharf M, Cooper J, Byrne D, Brayden D, Higgins L, Evans C und O'Mahony D. **2004.** Cell culture modeling of specialized tissue: identification of genes expressed specifically by follicle-associated epithelium of Peyer's patch by expression profiling of Caco-2/Raji co-cultures. *Int Immunol.* Vol. 16: No. 1: 91–99.

Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, Mortensen A, Lam HR und Larsen EH. **2011.** Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Particle and Fibre Toxicology* Vol. 8: No. 18: 1–14.

Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R und Pompa PP. **2010.** Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein-Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. *ACS Nano* Vol. 4: No. 10: 7481–7491.

Mann GE, Niehueser-Saran J, Watson A, Gao L, Ishii T, Winter P de und Siow RCM. **2007.** Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia. *Acta Physiologica Sinica* Vol. 59: No. 2: 117–127.

Mariadason J, Arango D, Corner GA, Aranes MJ, Hotchkiss KA, Yang W und Augenlicht LH. **2002.** A Gene Expression Profile That Defines Colon Cell Maturation in Vitro. *Cancer Research* Vol. 62: August 15: 4791–4804.

Miyayama T, Arai Y, Suzuki N und Hirano S. **2013.** Mitochondrial electron transport is inhibited by disappearance of metallothionein in human bronchial epithelial cells following exposure to silver nitrate. *Toxicology* Vol. 305: No. 1: 20–29.

Moltedo O. **2000.** Zinc Transport and Metallothionein Secretion in the Intestinal Human Cell Line Caco-2. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 275: No. 41: 31819–31825.

Morozevich GE, Kozlova NI, Chubukina AN und Berman AE. **2003.** Role of integrin alphavbeta3 in substrate-dependent apoptosis of human intestinal carcinoma cells. *Biochemistry* Vol. 68: No. 4: 416–423.

Mukherjee T, Squillantea E, Gillespieb M und Shao J. **2004.** Transepithelial Electrical Resistance is Not a Reliable Measurement of the Caco-2 Monolayer Integrity in Transwell. *Drug Delivery* Vol. 11: No. 1: 11–18.

Mukherjee B und Weaver JW. **2010.** Aggregation and Charge Behavior of Metallic and Nonmetallic Nanoparticles in the Presence of Competing Similarly-Charged Inorganic Ions. *Environmental Science & Technology* Vol. 44: No. 9: 3332–3338.

Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V und Thompson M. **2009.** Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials* Vol. 8: No. 7: 543–557.

Nishanth RP, Jyotsna RG, Schlager JJ, Hussain SM und Reddanna P. **2011.** Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway. *Nanotoxicology* Vol. 5: No. 4: 502–516.

Nowrouzi A, Meghrazi K, Golmohammadi T, Golestani A, Ahmadian S, Shafiezadeh M, Shajary Z, Khaghani S und Mmiri AN. **2010.** Cytotoxicity od Subtoxic AgNP in Human Hepatoma Cell Line (HepG2) after Long-Term Exposure. *Iran. Biomed. J.* Vol. 14: 1-2: 23–32.

Oba T, Yamaguchi M, Wang S und Johnson JD. **1992.** Modulation of the Ca2+ channel voltage sensor and excitation-contraction coupling by silver. *Biophys J.* Vol. 36: No. 5: 1416–1420.

Oberdörster G, Oberdörster E und Oberdörster J. **2007.** Concepts of Nanoparticle Dose Metric and Response Metric. *Environmental Health Perspectives* Vol. 115: No. 26: A290-293.

nanoComposix.com. **2013**. verfügbar unter: http://nanocomposix.com. zuletzt geprüft am 12.07.2013.

Otero-González L, Sierra-Alvarez R, Boitano S und Field JA. **2012.** Application and Validation of an Impedance-Based Real Time Cell Analyzer to Measure the Toxicity of Nanoparticles Impacting Human Bronchial Epithelial Cells. *Environmental Science & Technology* Vol. 46: No. 18: 120830165754004.

Ouellette AJ und Bevins CL. **2001.** Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflammatory Bowel Diseases* Vol. 7: No. 1: 43–50.

Owen RL, Apple RT und Bhalla DK. **1986.** Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: Their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. *The Anatomical Record* Vol. 216: No. 4: 521–527.

Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W und Jahnen-Dechent W. **2007.** Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* Vol. 3: No. 11: 1941–1949.

Paracelsus, T. **1538**. verfügbar unter: http://www.zeno.org/nid/20009261362. zuletzt geprüft am 12.07.2013.

Park H, Kim JY, Kim J, Lee J, Hahn J, Gu MB und Yoon J. **2009.** Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Research* Vol. 43: No. 4: 1027–1032.

Park E, Yi J, Kim Y, Choi K und Park K. **2010.** Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro* Vol. 24: No. 3: 872–878.

Park K, Park E, Chun IK, Choi K, Lee SH, Yoon J und Lee BC. **2011.** Bioavailability and Toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Archives of Pharmacal Research* Vol. 34: No. 1: 153–158.

Peters R, Kramer E, Oomen AG, Herrera Rivera ZE, Oegema G, Tromp PC, Fokkink R, Rietveld A, Marvin HJP, Weigel S, Peijnenburg AACM und Bouwmeester H. **2012.** Presence of Nano-Sized Silica during In Vitro Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive. *ACS Nano* Vol. 6: No. 3: 2441–2451.

Phillips TE und Frisch EB. **1990.** Secretory glycoconjugates of a mucin-synthesizing human colonic adenocarcinoma cell line. *Histochemistry* Vol. 93: No. 3: 311–317.

Pielage JF, Cichon C, Greune L, Hirashima M, Kucharzik T und Schmidt MA. **2007.** Reversible differentiation of Caco-2 cells reveals galectin-9 as a surface marker molecule for human follicle-associated epithelia and M cell-like cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Vol. 39: No. 10: 1886–1901.

Piret J, Vankoningsloo S, Mejia J, Noël F, Boilan E, Lambinon F, Zouboulis CC, Masereel B, Lucas S, Saout C und Toussaint O. **2012.** Differential toxicity of copper (II) oxide nanoparticles of similar hydrodynamic diameter on human differentiated intestinal Caco-2 cell monolayers is correlated in part to copper release and shape. *Nanotoxicology* Vol. 6: No. 7: 789–803.

Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E und Pele LC. **2010.** Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *Journal of Autoimmunity* Vol. 34: No. 3: J226.

Powers CM, Badireddy AR, Ryde IT, Seidler FJ und Slotkin TA. **2011.** Silver Nanoparticles Compromise Neurodevelopment in PC12 Cells: Critical Contributions of Silver Ion, Particle Size, Coating, and Composition. *Environ Health Perspect.* Vol. 119: No. 1: 37–44.

Prabhu SD und Salama G. **1990.** The Heavy Metal Ions Ag+ and Hg2+ Trigger Calcium Release from Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 277: No. 1: 47–55.

Promega. **2009.** CellTiter-Blue(R) Cell Viability Assay Technical Bulletin, TB317. Instructions for use of products G8080, G8081 and G8082.

Promega. **2011.** GSH/GSSG-Glo(TM) Assay Technical Manual TM344. Instructions for use of products V6611 and V6612.

Promega. **2012.** Caspase-Glo 3/7 Assay Technical Bulletin, TB323. Instructions for use of products G8090, G8091, G8092 and G8093.

Rai M, Yadav A und Gade A. **2009.** Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* Vol. 27: No. 1: 76–83.

Rechkemmer G, Wahl M, Kuschinsky W und Engelhardt W. **1986.** pH-microclimate at the luminal surface of the intestinal mucosa of guinea pig and rat. *Pflügers Archiv* Vol. 407: No. 1: 33-40.

Rehner G und Daniel H. **2010.** Biochemie der Ernährung. 3. Auflage, 3rd ed., *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*. ISBN 978-3-8274-2041-1.

nanotechproject.org. **2012**. verfügbar unter: http://www.nanotechproject.org. zuletzt geprüft am 23.12.2012.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM und Aggarwal BB. **2010.** Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* Vol. 49: No. 11: 1603–1616.

Ribble D, Goldstein NB, Norris DA und Shellman YG. **2005.** A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology* Vol. 5: No. 1: 12.

Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR und Gardea-Torresdey JL. **2011.** Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 59: No. 8: 3485–3498.

Römer I, White TA, Baalousha M, Chipman K, Viant MR und Lead JR. **2011.** Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *Journal of Chromatography A* Vol. 1218: No. 27: 4226–4233.

Russell-Jones GJ, Veitch H und Arthur L. **1999.** Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells. *International Journal of Pharmaceutics* Vol. 190: No. 2: 165–174.

Ruttkay-Nedecky B, Nejdl L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V und Kizek R. **2013.** The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* Vol. 14: No. 3: 6044–6066.

Salama G und Abramson J. **1984.** Silver Ions Trigger Ca2+ Release by Acting at the Apparent Physiological Release Site in Sarcoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 259: No. 21: 13363–13369.

Samberg ME, Orndorff PE und Monteiro-Riviere NA. **2011.** Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. *Nanotoxicology* Vol. 5: No. 2: 244–253.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M und Ragg T. **2006.** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* Vol. 7: No. 3: 3.

Schulze C, Kroll A, Lehr C, Schäfer UF, Becker K, Schnekenburger J, Schulze Isfort C, Landsiedel R und Wohlleben W. **2008.** Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* Vol. 2: No. 2: 51–61.

Shah P, Jogani V, Bagchi T und Misra A. **2006.** Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption. *Biotechnology Progress* Vol. 22: No. 1: 186–198.

Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P und Dash D. **2007.** Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* Vol. 18: No. 22: 1–9.

Siegrist M, Stampfli N, Kastenholz H und Keller C. **2008.** Perceived risks and perceived benefits of different nanotechnology foods and nanotechnology food packaging. *Appetite* Vol. 51: No. 2: 283–290.

sigmaaldrich.com. **2013**. verfügbar unter: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/16201?lang=de&region=DE. zuletzt geprüft am 10.07.2013.

Silver S. **2003.** Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews* Vol. 27: 2-3: 341–353.

Simmons SO, Fan C, Yeoman K, Wakefield J und Ramabhadran R. **2011.** NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Current Chemical Genomics* Vol. 5: No. 1: 1–12.

Song H, Li B, Lin Q, Wu H und Chen Y. **2011.** Migration of silver from nanosilver–polyethylene composite packaging into food simulants. *Food Additives & Contaminants: Part A* Vol. 28: No. 12: 1758–1762.

Spehlmann ME und Eckmann L. **2009.** Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Current Opinion in Gastroenterology* Vol. 25: No. 2: 92–99.

Stoddart MJ. **2011.** Mammalian Cell Viability. Methods and Protocols, *Humana Press Davos*. ISBN 978-1-61779-108-6.

Stoehr LC, Gonzalez E, Stampfl A, Casals E, Duschl A, Puntes V und Oostingh GJ. **2011.** Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* Vol. 8: No. 1: 36.

Sun D, Lennernas H, Welage LS, Barnett JL, Landowski CP, Foster D, Fleisher D, Lee K und Amidon GL. **2002.** Comparison of Human Duodenum and Caco-2 Gene Expression Profiles for 12,000 Gene Sequences Tags and Correlation with Permeability of 26 Drugs. *Pharmaceutical Research* Vol. 19: No. 10: 1400–1416.

Sun H, Chow ECY, Liu S, Du Y und Pang KS. **2008.** The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* Vol. 4: No. 4: 395–411.

Sur I, Altunbek M, Kahraman M und Culha M. **2012.** The influence of the surface chemistry of silver nanoparticles on cell death. *Nanotechnology* Vol. 23: No. 37: 375102.

Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, Morrell-Falvey JL, Gu B und Doktycz MJ. **2012.** Cytotoxicity Induced by Engineered Silver Nanocrystallites Is Dependent on Surface Coatings and Cell Types. *Langmuir* Vol. 28: No. 5: 2727–2735.

Suzuki T und Hara H. **2004.** Various Nondigestible Saccharides Open a Paracellular Calcium Transport Pathway with the Induction of Intracellular Calcium Signaling in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Nutrient Interactions and Toxicity* Vol. 134: No. 8: 1935–1941.

Suzuki Y, Inoue T und Ra C. **2011.** Autoimmunity-inducing metals (Hg, Au and Ag) modulate mast cell signaling, function and survival. *Current pharmaceutical design* Vol. 17: No. 34: 3805–3814.

Szentkuti L und Enss M. **1998.** Comparative Lectin-histochemistry on the Pre-epithelial Mucus Layer in the Distal Colon of Conventional and Germ-free Rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* Vol. 119: No. 1: 379–386.

Tait JF. **2008.** Imaging of Apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine* Vol. 49: No. 10: 1573–1576.

Teodoro JS, Simões AM, Duarte FV, Rolo AP, Murdoch RC, Hussain SM und Palmeira CM. **2011.** Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicology in Vitro* Vol. 25: No. 3: 664–670.

Thannickal VJ und Fanburg BL. **2000.** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Vol. 279: No. 6: 1005–1028.

Throbäck IN, Johansson M, Rosenquist M, Pell M, Hansson M und Hallin S. **2007.** Silver (Ag+) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 270: No. 2: 189–194.

Thubagere A und Reinhard BM. **2010.** Nanoparticle-Induced Apoptosis Propagates through Hydrogen-Peroxide-Mediated Bystander Killing: Insights from a Human Intestinal Epithelium In Vitro Model. *ACS Nano* Vol. 4: No. 7: 3611–3622.

Tupling R und Green H. **2002.** Silver ions induce Ca2+ release from the SR in vitro by acting on the Ca2+ release channel and the Ca2+ pump. *J Appl Physiol* Vol. 92: No. 4: 1603–1610.

Tyrer P, Foxwell AR, Kyd J, Harvey M, Sizer P und Cripps A. **2002.** Validation and quantitation of an in vitro M-cell model. *Biochemical and Biophysical Resurch Communications* Vol. 299: No. 3: 377–383.

Vachon PH, Harnois C, Grenier A, Dufour G, Bouchard V, Han J, Landry J, Beaulieu J, Vézina A, Dydensborg AB, Gauthier R, Côté A, Drolet J und Lareau F. **2002.** Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* Vol. 123: No. 6: 1980–1991.

Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M und Mazur M. **2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* Vol. 160: No. 1: 1–40.

Vikström E, Bui L, Konradsson P und Magnusson K. **2010.** Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule. *European Journal of Cell Biology* Vol. 89: No. 8: 584–597.

Vippola M, Falck G, Lindberg H, Suhonen S, Vanhala E, Norppa H, Savolainen K, Tossavainen A und Tuomi T. **2009.** Preparation of nanoparticle dispersions for in-vitro toxicity testing. *Human & Experimental Toxicology* Vol. 28: 6-7: 377–385.

VO (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates der Europäischen Union über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten vom 27.01.1997, zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 596/2009 (ABl. L 188 vom 18.7.2009, S. 14–92). *ABl. L 43 vom 14.2.1997, S. 1*.

VO (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates der Europäischen Union zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit vom 28.01.2002 zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 596/2009 (ABl. L 188 vom 18.7.2009, S. 14–92). *ABl. L 31 vom 1.2.2002, S. 1–24*.

VO (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über kosmetische Mittel vom 30.11.2009 zuletzt geändert durch Verordnung (EU) Nr. 483/2013 (ABl. L 139 vom 25.5.2013, S. 8–10). *ABl. L 342 vom 22.12.2009, S. 59–209*.

VO (EU) Nr. 10/2011 der Kommission über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen vom 14.01.2011 zuletzt geändert durch Verordnung (EU) Nr. 1183/2012 (ABl. L 338 vom 12.12.2012, S. 11–15). *ABl. L 12 vom 15.1.2011, S. 1–89*.

VO (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission vom 25.10.2011), *ABl. L 304 vom 22.11.2011, S. 18–63*.

VO (EU) Nr. 528/2012. Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten vom 22.05.2012, *ABl. L 167 vom 27.6.2012, S. 1–123*.

Volkheimer G. **1974.** Passage of Particles trough the Wall of the Gastrointestinal Tract. *Environmental Health Perspectives* Vol. 9: No. 1: 215–225.

Walczak AP, Fokkink R, Peters R, Tromp P, Herrera Rivera ZE, Rietjens IM, Hendriksen PJ und Bouwmeester H. **2012.** Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology* online veröffentlicht: 1–13.

Walter E, Janich S, Roessler BJ, Hilfinger JM und Amidon GL. **1996.** HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 85: No. 10: 1070–1076.

Weiss J, Takhistov P und McClements DJ. **2006.** Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science* Vol. 71: No. 9: R107.

Whitmarsh AJ und Davis RJ. **1996.** Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* Vol. 74: No. 10: 589–607.

Wijnhoven SW, Peijnenburg WJ, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EH, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, van de Meent D, Dekkers S, Jong WH de, van Zijverden M, Sips AJ und Geertsma RE. **2009.** Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* Vol. 3: No. 2: 109–138.

Xiu Z, Zhang Q, Puppala HL, Colvin VL und Alvarez PJJ. **2012.** Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Letters* Vol. 12: No. 8: 4271–4275.

Yamanaka M, Hara K und Kudo J. **2005.** Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on Escherichia coli, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 71: No. 11: 7589–7593.

Yang X, Gondikas AP, Marinakos SM, Auffan M, Liu J, Hsu-Kim H und Meyer JN. **2012.** Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in Caenorhabditis elegans. *Environmental Science & Technology* Vol. 46: No. 2: 1119–1127.

Zande M von der, Vandebriel RJ, van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, Gremmer ER, Mast J, Peters RJB, Hollman PCH, Hendriksen PJM, Marvin HJP, Peijnenburg AACM und Bouwmeester H. **2012.** Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. *ACS Nano* Vol. 6: No. 8: 7427–7442.

Zhang W, Kalive M, Capco DG und Chen Y. **2010.** Adsorption of hematite nanoparticles onto Caco-2 cells and the cellular impairments: effect of particle size. *Nanotechnology* Vol. 21: No. 35: 355103.

Zhang H, Burnum KE, Luna ML, Petritis BO, Kim J, Qian W, Moore RJ, Heredia-Langner A, Webb-Robertson BM, Thrall BD, Camp DG, Smith RD, Pounds JG und Liu T. **2011a.** Quantitative proteomics analysis of adsorbed plasma proteins classifies nanoparticles with different surface properties and size. *Proteomics* Vol. 11: No. 23: 4569–4577.

Zhang W, Yao Y, Li K, Huang Y und Chen Y. **2011b.** Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles. *Environmental Pollution* Vol. 159: No. 12: 3757–3762.

Zhang W, Yao Y, Sullivan N und Chen Y. **2011c.** Modeling the Primary Size Effects of Citrate-Coated Silver Nanoparticles on Their Ion Release Kinetics. *Environ. Sci. Technol* Vol. 45: No. 10: 4422–4428.

Zhang H, Smith JA und Oyanedel-Craver V. **2012.** The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. *Water Research* Vol. 46: No. 3: 691–699.

Zhang S, Du C, Wang Z, Han X, Zhang K und Liu L. **2013.** Reduced cytotoxicity of silver ions to mammalian cells at high concentration due to the formation of silver chloride. *Toxicology in Vitro* Vol. 27: No. 2: 739–744.

Zimmer R, Hertel R and Böl G. **2008.** Wahrnehmung der Nanotechnologie in der Bevölkerung. Repräsentativerhebung und morphologisch-psychologische Grundlagenstudie.

ZZulV. Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung - ZZulV) vom 29.01.1998 zuletzt geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 21.05.2012 (BGBl. I S. 1201). *BGBl. I S. 230, 231.*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Größenverhältnisse verschiedener natürlich vorkommender Objekte im Vergleich zu Nanopartikeln. 1

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren auf die Toxizität von Nanopartikeln. 10

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Oberflächenvergrößerung der Dünndarminnenwand durch Kerckring`sche Falten, Zotten und Mikrovilli. 15

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufnahmewege von Partikeln im intestinalen Epithel. 17

Abbildung 5: TEM-Aufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Silbernanopartikel. 25

Abbildung 6: Chemische Strukturen der Moleküle, die zur Beschichtung der Silbernanopartikel verwendet wurden. 27

Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Transwells®. 32

Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Inkubation von Caco-2 Zellen mit Silberionen, die von den Silbernanopartikeln freigesetzt werden, ohne einen Kontakt der Nanopartikel mit den Zellen zu ermöglichen. 37

Abbildung 9: Funktionsweise des xCelligence-Systems der Firma Roche, in dem über Elektroden am Boden der 96-*well* Platte der Zellwiderstand in Abhängigkeit von Zellstärke, Zellbindung und Zellanzahl gemessen wird. 40

Abbildung 10: Silbergehalte des Zellmonolayers im Transwell® nach 24 h Inkubation mit Silbernitrat oder Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln. 50

Abbildung 11: TEM Aufnahmen von differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln in serumfreiem Medium. 51

Abbildung 12: TEM Aufnahmen von differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln in serumhaltigem Medium. 52

Abbildung 13: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 4, 24 und 48 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln sowie Beschichtungskontrolle und Silberionen. 54

Abbildung 14: CTB Assay und DAPI Färbung an differenzierten Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 4, 24 und 48 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln sowie Beschichtungskontrolle und Silberionen. 55

Abbildung 15: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in 100 und 300 µL Inkubationsvolumen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 und 48 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln und Silberionen. 57

Abbildung 16: Vergleich der Zytotoxizität von proliferierenden und differenzierten Caco-2 sowie HepG2, HT-29/B6 und Raji Zellen mittels CTB Assay und DAPI Färbung in serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln sowie Silberionen. 58

Abbildung 17: Vergleich der Zytotoxizität der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von der Konzentrationsangabe. 59

Abbildung 18: Vergleich der Zytotoxizität von Silbernanopartikeln mit unterschiedlicher Beschichtung. CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumhaltigem

Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-, Peptid-, PVP- und Tannin-beschichteten Silbernanopartikeln sowie einem kommerziell erhältlichen Nahrungsergänzungsmittel. 60

Abbildung 19: Untersuchung der Silberionenfreisetzung von Silbernanopartikeln in serumhaltigem und serumfreiem Zellkulturmedium. 62

Abbildung 20: Untersuchung der Silberionenfreisetzung von Silbernanopartikeln in serumhaltigem Zellkulturmedium. Verschiedene Silbernanopartikel wurden 24 h in Zellkulturmedium bei 37 °C im Dunkeln (Zellkulturschrank) inkubiert. 63

Abbildung 21: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln oder Silbernitrat sowie dem Zentrifugationsüberstand der 24 h in Zellkulturmedium vorinkubierten Silbernanopartikeln oder Silbernitrat. 64

Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen von proliferierenden und differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Silberionen und Beschichtungskontrolle in serumfreiem und serumhaltigem Medium. 67

Abbildung 23: Impedanzmessung an proliferierenden Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium über eine Inkubationszeit von 48 h mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln, Silberionen sowie der Beschichtungskontrolle. 69

Abbildung 24: Impedanzmessung an differenzierten Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium über eine Inkubationszeit von 48 h mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln, Silberionen sowie der Beschichtungskontrolle. 70

Abbildung 25: Detektion von Caspaseaktivität an differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln in serumfreiem Medium mittels Image-iT und Caspase Glo® Kit. 71

Abbildung 26: Annexin V / 7AAD Färbung an proliferierenden Caco-2 Zellen in serumfreiem Medium nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln. 72

Abbildung 27: Messung des oxidativen Stresses an differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, der Beschichtung als Kontrolle, Silberionen sowie 100 µg/mL Eisen als $FeSO_4$ als Positivkontrolle. 73

Abbildung 28: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumfreiem Medium nach 1 h Vorinkubation mit *N*-Acetylcystein (NAC) und Vitamin C und 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln. 74

Abbildung 29: Messung des Glutathionstatus von differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silberionen. 75

Abbildung 30: Messung des Calcium Fluxes in proliferierenden und differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Beschichtungskontrolle und Silberionen. 77

Abbildung 31: CTB Assay und DAPI Färbung an proliferierenden Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium in aufrechter Position und über Kopf nach 24 h Inkubation mit Tensid-stabilisierten Silbernanopartikeln und Silberionen. 78

Abbildung 32: Messung der mitochondrialen Depolarisation an differenzierten Caco-2 Zellen in serumfreiem und serumhaltigem Medium nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, der Beschichtung als Kontrolle, Silberionen sowie 2,5 µM Staurosporin als Positivkontrolle. 79

Abbildung 33: Venn-Diagramm und Heatmap der Gene der differenzierten Caco-2 Zellen, die 24 h mit 2,5 und 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und 0,5 µg/mL Silbernitrat in serumfreiem Medium inkubiert wurden, deren mRNA Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant ($p < 0,05$) mindestens 1,4 fach differenziell reguliert war. _____ 80

Abbildung 34: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Stress und Entzündung aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. _____ 83

Abbildung 35: Netzwerk der Gene aus der Gruppe zelluläre Morphologie und Bewegung aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. ___ 84

Abbildung 36: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Zelltod und Apoptose aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. _____ 85

Abbildung 37: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Zellzyklus und Proliferation aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. _____ 86

Abbildung 38: Netzwerk der Gene aus der Gruppe Zell-Zell Kommunikation und zelluläre Signalwege aus der Liste der Gene, die sowohl im Micro-Array als auch im PCR-Array betrachtet wurden. _____ 87

Abbildung 39: Vergleich der Viabilität proliferierender Caco-2 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Silberspezies und der im Zentrifugationsüberstand befindlichen Menge an Silber im Zellkulturmedium. _____ 95

Abbildung 40: Übersicht über die möglichen Wechselwirkungen und die Ionenfreisetzung von Silbernanopartikeln in wässriger Lösung. _____ **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Abbildung 41: Übersicht über die Wechselwirkung und Wirkung von Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln mit differenzierten Caco-2 Zellen. _____ 107

Abbildung A1: Messungen des TEER und des Fluorescein-Dextran Durchtritts der mit verschiedenen Silberspezies inkubierten Transwells®. _____ XLIII

Abbildung A2: Legende für die nachfolgenden Abbildungen aus der IPA Analyse der Micro-Array Daten. _____ XLVI

Abbildung A3: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Calcium Trnasport I*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 2,5 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____XLVII

Abbildung A4: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Actin Cytoskeleton Siganaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____ LV

Abbildung A5: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway)* "*NRF2-mediated Oxidative Stress Response*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____LVI

Abbildung A6: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway)* "*FAK Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____ LVII

Abbildung A7: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Integrin Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____ LVIII

Abbildung A8: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*ILK Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____LIX

Abbildung A9: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Epithelial Adherens Junction Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____ LX

Abbildung A10: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Tight Junction Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. _____LXI

Abbildung A11: Netzwerk (*Top Network*) "*Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Development*" (*Score* 72) der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 0,5 µg/mL Silberionen inkubiert wurden. _____ LXIII

Abbildung A12: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway)* "*PPARa/RXRa Activation*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 0,5 µg/mL Silberionen inkubiert wurden. _____ LXIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Silbernanopartikel. 28

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Inkubationsvolumina. 32

Tabelle 3: Übersicht der Primer mit Sequenz, Fragmentgröße und Effizienz. 39

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen *real time* RT-PCR Analyse der differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Silberionen in Form von Silbernanopartikeln, die durch eine Dialysemembran von den Zellen getrennt wurden, und der Beschichtung der Nanopartikel in serumhaltigem Medium. 65

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen *real time* RT-PCR Analyse der differenzierten Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln, Silberionen in Form von Silbernanopartikeln, die durch eine Dialysemembran von den Zellen getrennt wurden, und der Beschichtung der Nanopartikel in serumfreiem Medium. 66

Tabelle 6: Anzahl der Gene, deren mRNA Expression im Vergleich zu Mediumkontrolle signifikant ($p < 0,05$) mindestens 1,4 fach reguliert war. 80

Tabelle A1: Übersicht über einige Eigenschaften der Silbernanopartikel aus der Literatur, die in der Diskussion zitiert wurde. XXXIX

Tabelle A2: Übersicht über einige Eigenschaften der Nanopartikel aus der Literatur, die in der Diskussion zitiert wurde. XLII

Tabelle A3: Tabellarische Übersicht über den Vergleich der Ergebnisse des PCR-Arrays und des Micro-Arrays. Für die Transkriptomanalysen wurden differenzierte Caco-2 Zellen 24 h mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silberionen inkubiert. XLIV

Tabelle A4: Tabellarische Übersicht über den Vergleich der Ergebnisse des PCR-Arrays und des Micro-Arrays. Fortsetzung der vorherigen Seite. XLV

Anhang

Liste der Genabkürzungen

ACTB	β-Aktin (*actin, beta*)
ACTG2	γ-Aktin 2 (*actin, gamma 2*)
ACTN2	α-Aktinin 2 (*actinin, alpha 2*)
ACTN4	α-Aktinin 4 (*actinin, alpha 4*)
ADAM21	ADAM-Metallopeptidase-Domäne 21 (*ADAM Metallopeptidase Domain 21*)
ADH4	Alkoholdehydrogenase (*alcohol dehydrogenase 4*)
AGT	Angiotensinogen (*angiotensinogen*)
AKT	Proteinkinase B (*protein kinase B*) (PKBα/β/γ, Gene: AKT1, AKT2, AKT3)
AKT3	γ-Proteinkinase B (*Protein Kinase B, Gamma*)
ALB	Albumin (*albumin*)
AP-1	Aktivatorprotein 1 (*activator protein 1*)
APOC3	Apolipoprotein C-III (*apolipoprotein C-III*)
APOE	Apolipoprotein E (*apolipoprotein E*)
ARP	Aktin-bezogenes Protein 2/3 Komplex (*actin-related proteins 2/3 complex*)
ASAP1	*ArfGAP with SH3 domain, ankyrin reapeat and PH domain 1*
ATF3	aktivierender Transkriptionsfaktor 3 (*activating Transcription factor 3*)
ATM	Serin-Proteinkinase ATM (*ataxia Telangiectasia Mutated*)
ATP2C2	Ca^{2+} transportierende ATPase, Typ 2C (*ATPase, Ca^{2+} transporting, Type 2C*)
B2M	β_2-Mikroglobulin (*beta-2-microglobulin*)
BAG3	*BCL2-associated athanogene 3*
BCL10	*B-cell CLL/lymphoma 10*
BCL2L11	*BCL2-like 11*
BDNF	vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (*brain-derived neurotrophic factor*)
BMP6	knochenmorphogenetisches Protein 1 (*bone morphogenetic protein 6*)
BRAF	*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
BTK	Bruton-Tyrosinkinase (*bruton tyrosine kinase*)
C2orf51	Chromosom 2 offenes Leseraster 51 (*chromosome 2 open reading frame 51*)
CALM3	Calmodulin 3 (*calmodulin 3*)
CAMK2D	Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IIδ (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta*)
CAMK4	Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV*)
CAMKII	Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (*calcium/calmodulin-dependent protein kinases II*)
CAPN10	Calpain 10 (*calpain 10*)
CAPN3	Calpain 3 (*calpain 3*)
CAT	Katalase (*catalase*)
CCL5	Chemokin C-C-Motiv-Ligand 5 (*chemokine (C-C motif) ligand 5*)

CCR9	Chemokin C-C-Motiv-Rezeptor 9 (*chemokine (C-C motif) receptor 9*)
CCND1	Cyclin D1 (*cyclin D1*)
CCT5	T-Komplexprotein 1 Untereinheit ε (*T-complex protein 1 subunit epsilon*)
CCT8	T-Komplexprotein 1 Untereinheit θ (*T-complex protein 1 subunit theta*)
CD53	Leukozytenoberflächen-Antigen CD53 (*leukocyte surface antigen CD53*)
CDH6	Cadherin 6 (*cadherin 6*)
CDKN1A	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*)
CEP290	zentrosomales Protein mit 290 kD (*centrosomal protein of 290 kDa*)
CFTR	*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
CHK	Serin-/Threonin-Proteinkinase Chk 1 (*Serine/threonine-protein kinase Chk1*)
CHN1	Chimerin 1 (*chimerin 1*)
CHRM1	*muscarinic acetylcholine receptor M_1*
c-JUN	Proto-Onkogen Jun (*Jun Proto-Oncogene*)
CLDN3	Claudin 3 (*claudin 3*)
CLGN	Calmegin (*calmegin*)
CLTB	Clathrin B (*clathrin light chain B*)
COBRA1	Cofaktor von BRACA1 (*cofactor of BRCA1*)
COL5A2	Collagen α2 Typ V (*collagen, type V, alpha 2*)
COX6B2	Cytochrom c Oxidase Untereinheit 6B2 (*cytochrome c oxidase subunit 6B2*)
CREB1	cAMP-ansprechbares-Element Bindungsprotein 1 (*cAMP responsive element binding protein 1*)
CREM	cAMP-ansprechbares-Element Regulator (*cAMP responsive element modulator*)
CRTC2	CERB-regulierter Transkriptionscoaktivator 2 (*CREB regulated transcription coactivator 2*)
CTAGE5	Kutanes T-Zell-Lymphoma-assoziiertes Antigen 5 (*Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 5*)
CTNND1	Catenin δ1 (*catenin delta 1*)
CTTN	Cortactin (*cortactin*)
CUX1	*cut-like homeobox 1*
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (*chemokine (C-X-C motif) receptor 4*)
CYFIP2	Zytoplasmatisches FMR1 interagierendes Protein 2 (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 2*)
CYR61	Cystein-reiches Angiogeneseinduzierer 61 (*cysteine-rich angiogenic inducer 61*)
DACH1	Dackelhomolog 1 (*dachshund homolog 1*)
DAPK1	Tod-assoziierte Proteinkinase 1 (*death-associated protein kinase 1*)
DIDO1	*death inducer-obliterator 1*
DNAJB6	*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6*
DNMT3B	DNA-Methyltransferase 3β (*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta*)
DOCK1	*dedicator of cytokinesis 1*
DOCK8	*dedicator of cytokinesis 8*
DUSP1	Dualspezifische Phosphatase 1 (*dual specificity phosphatase 1*)

DUSP2	Dualspezifische Phosphatase 2 (*dual specificity phosphatase 2*)
DUSP4	Dualspezifische Phosphatase 4 (*dual specificity phosphatase 4*)
DUSP6	Dualspezifische Phosphatase 6 (*dual specificity phosphatase 6*)
DUSP9	Dualspezifische Phosphatase 9 (*dual specificity phosphatase 9*)
EDN1	Endothelin 1 (*endothelin 1*)
EDN3	Endothelin 3 (*endothelin 3*)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*)
EGR1	frühe Wachstumsantwort 1 (*early growth response 1*)
EIF2AK2	eukaryotische Translationsinitiierungsfaktor 2α Kinase 2 (*eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2*)
EPB41L3	Erythrozytmembranprotein band 4.1-like 3 (*erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3*)
EPHX2	Epoxidhydrolase 2 (*epoxide hydrolase 2*)
ERBB2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)
ERBB3	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 3 (*human epidermal growth factor receptor 3*)
ERK	extracellular-signal-regulierte Kinase (*extracellular-signal-regulated kinases*) ERK1 = MAPK3, ERK2 = MAPK2, ERK5 = MAPK5
ETS1	Protein C-ets-1 (*Protein C-ets-1*)
ETV5	est-Variante 5 (*ets variant 5*)
EXT1	Exostosin 1 (*exostosin 1*)
F2	Thrombin (*coagulation factor II, thrombin*)
F2R	Thrombinrezeptor (*thrombin receptor*)
F7	Coagulationsfaktor VII (*coagulation factor VII*)
FAK	Focal Adhesion Kinase (*focal adhesion kinase*) = PTK2
FAM120C	Familie mit Sequenzähnlichkeiten 120C (*family with sequence similarity 120C*)
FAM129A	Familie mit Sequenzähnlichkeiten 129 Mitglied A (*family with sequence similarity 129, member A*)
FAM170B	Familie mit Sequenzähnlichkeiten 170 Mitglied B (*family with sequence similarity 170, member B*)
FAM171B	Familie mit Sequenzähnlichkeiten 171 Mitglied B (*family with sequence similarity 171, member B*)
FAM208B	Familie mit Sequenzähnlichkeiten 208 Mitglied B (*family with sequence similarity 208, member B*)
FCHSD1	FCH und doppel-SH3 Domänen 1 (*FCH and double SH3 domains 1*)
Fcor	Foxo 1 Corepressor (*Foxo1 corepressor*)
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (*fibroblast growth factor 2*)
FLI1	*Friend leukemia virus integration 1*
FN1	Fibronektin 1 (*fibronectin 1*)
FOS	FBJ Mausosteosarkoma viral Onkogen Homolog (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*)
FOSB	FBJ Mausosteosarkoma viral Onkogen Homolog B (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*)
FOSL1	FOS-artiges Antigen 1 (*FOS-like antigen 1*)

FOXO3	Forkhead-Box-Protein O3 (*forkhead box O3*)
FRY	*furry homolog*
GABRB1	Gammabuttersäure A Rezeptor β1 (*gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1*)
GADD45B	Wachstumsarrest und DNA-Schaden-induziertbar β (*growth arrest and DNA-damage-inducible, beta*)
GATA4	GATA Bindungsprotein 4 (*GATA binding protein 4*)
GDNF	Gliazelle-abgeleitete neurothrophischer Faktor (*glial cell derived neurotrophic factor*)
GPI	Glucose-6-phosphat-Isomerase (*glucose-6-phosphate isomerase*)
GRHL2	*grainyhead-like protein 2*
GST	Glutathion-S-Transferase
GSTA1	Glutathion-S-Transferase α1 (*glutathione S-transferase alpha 1*)
GSTA2	Glutathion-S-Transferase α2 (*glutathione S-transferase alpha 2*)
GSTA4	Glutathion-S-Transferase α4 (*glutathione S-transferase alpha 4*)
HARS	Histidin-tRNA Ligase (*histidine-tRNA ligase*)
HDAC6	Histondeacetylase 6 (*histone deacetylase 6*)
HER-2	Humane epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)
HGF	Hepathozytenwachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*)
HIF1A	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*)
HIST1H2AG	Histon H2A Typ 1 (*Histone H2A type 1*)
HMGA1Δ	High-Mobility-Group-Protein A1Δ (*High-mobility group protein A1⊿*)
HMOX1	Hemeoxygenase 1 (*heme oxygenase 1*)
HNF1A	Hepatozyten-nuklear Faktor 1 Homöobox A (*hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A*)
HNF4A	Hepatozyten-nuklear Faktor 4α (*hepatocyte nuclear factor 4, alpha*)
HOXA11	Homöobox A11 (*homeobox A11*)
HOXA5	Homöobox A5 (*homeobox A5*)
HSD17B4	Hydroxysteroid 17β Dehydrogenase 4 (*hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4*)
HSF2	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 2 (*heat shock transcription factor 2*)
HSPA1A	Hitzeschockprotein 70kDa 1A (*heat shock 70kDa protein 1A*)
HSPA1B	Hitzeschockprotein 70kDa 1B (*heat shock 70kDa protein 1B*)
HSPA6	Hitzeschockprotein 70kDa 6 (*heat shock 70kDa protein 6*)
HSPH1	Hitzeschockprotein 105kDa/110kDa 1 (*heat shock 105kDa/110kDa protein 1*)
ID1	DNA-Bindung Protein Inhibitor ID-1 (*DNA-Binding Protein Inhibitor ID-1*)
IFIT1	Interferon-induziertes Protein mit Tetratricopeptid-Wiederholungen 1 (*interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*)
IFNA13	Interferon α13 (*interferon, alpha 13*)
IFNA16	Interferon α16 (*interferon, alpha 16*)
IFNA2	Interferon α2 (*interferon, alpha 2*)
IFNAR2	Interferonrezepror 2 (*interferon receptor 2*)
IFNB1	Interferon β1 (*interferon, beta 1*)
IFNK	Interferon ϰ (*interferon, kappa*)
IFNL1	Interferon λ1 (*interferon, lambda 1*)
IGF1	Insulin-artiger Wachstumsfaktor 1 (*insulin-like growth factor 1*)
IGFBP7	Insulin-artiger Wachstumsfaktor Bindungsprotein 7 (*insulin-like growth factor binding protein 7*)

IL1B	Interleukin 1β (*interleukin 1, beta*)
IL1RN	Interleukin 1 Rezeptorantagonist (*interleukin 1 receptor antagonist*)
IL2	Interleukin 2 (*interleukin 2*)
IL3	Interleukin 3 (*interleukin 3*)
IL4	Interleukin 4 (*interleukin 4*)
ILK	Inegrin-linked Kinase (*integrin-linked kinase*)
INHBA	Inhibin βA (*inhibin, beta A)*
INSIG1	Insulin induziertes Gen 1 (*insulin induced gene 1*)
INSR	Insulinrezeptor *(insulin receptor*)
IRF1	Interferon-regulierender Faktor 1 (*interferon regulatory factor 1*)
IRF3	Interferon-regulierender Faktor 3 (*interferon regulatory factor 3*)
IRF7	Interferon-regulierender Faktor 7 (*interferon regulatory factor 7*)
IRGM	Immunität-vermittelte GTPase Familie M (*immunity-related GTPase family, M*)
ITGA2	Integrin α2 (*integrin, alpha 2*)
ITGB1	Integrin β1 (*integrin, beta 1*)
ITPR2	Inositol 1,4,5-triphosphat-Rezeptor Typ 2 (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2*)
JMJD1C	*jumonji domain containing 1C*
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen (*c-Jun N-terminal kinase*)
JUN	JUN Onkogen (*jun oncogene*)
KCNIP3	Calsenilin (*calsenilin*)
KEAP1	Kelch-like ECH-assoziiertes Protein 1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*)
KLB	Klothoβ (*klotho beta*)
KLF15	krüppel-like Faktor 15 (*krüppel-like factor 15*)
KNG1	Kininogen 1 (*kininogen 1*)
KRAS	GTPase KRas (*GTPase KRas*)
LENG1	Leukozytenrezeptor Klustermitglied 1 Homolog (*leukocyte receptor cluster member 1 homolog*)
LHX1	LIM Homöobox 1 (*LIM homeobox 1*)
LPL	Lipoproteinlipase (*lipoprotein lipase*)
MAGEB4	Melanoma-assoziiertes Antigen B4 (*melanoma-associated antigen B, 4*)
MAP1A	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1A (*microtubule-associated protein 1A*)
MAP2K1	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase 1 (*mitogen-activated protein kinase kinase 1*)
MAP2K2	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase 2 (*mitogen-activated protein kinase kinase 2*)
MAP2K4	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase 4 (*mitogen-activated protein kinase kinase 4*)
MAP2K7	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase 7 (*mitogen-activated protein kinase kinase 7*)
MAP3K1	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase 1, E3 Ubiquitin-Protein-Ligase (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase*)
MAP3K3	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 3 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3*)
MAPK3	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase 3 (*mitogen-activated protein kinase 3*)
MCAM	Melanoma Zelladhäsionsmolekül (*melanoma cell adhesion molecule*)
MCL1	Myeloid Zellleukemiasequenz 1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*)
MEK	MAP-Kinase-Kinase (*MAP kinase kinase*)
METAP1D	Methionyl-aminopeptidase Typ 1D (*methionyl aminopeptidase type 1D*)

MITF	Mikrophthalmie-assoziierter Transkriptionsfaktor (*microphthalmia-associated transcription factor*)
MKL1	*megakaryoblastic leukemia (translocation) 1*
MKL2	MKL/ Myocardin-artig 2 (*MKL/myocardin-like 2*)
MLCK	Myosin leichte Kette Kinase (*myosin light-chain kinase*) = MYLK
MLLT10	Protein AF-10 (*protein AF-10*)
MMP1	Matrixmetallopeptidase 1 (*matrix metallopeptidase 1*)
MMP10	Matrixmetallopeptidase 10 (*matrix metallopeptidase 10*)
MMP11	Matrixmetallopeptidase 11 (*matrix metallopeptidase 11*)
MMP7	Matrixmetallopeptidase 7 (*matrix metallopeptidase 7*)
MMP9	Matrixmetallopeptidase 9 (*matrix metallopeptidase 9*)
MPHOSPH8	M-Phase Phosphoprotein 8 (*M-phase phosphoprotein 8*)
MRP	Multidrug-Resistance-assoziiertes Protein (*multidrug Resistance-associated Proteine*)
MSTN	Myostatin (*myostatin*)
MT1F	Metallothionein 1F (*metallothionein 1F*)
MT1G	Metallothionein 1G (*metallothionein 1G*)
MT1H	Metallothionein 1H (*metallothionein 1H*)
MT1M	Metallothionein 1M (*metallothionein 1M*)
MT1X	Metallothionein 1X (*metallothionein 1X*)
MT2A	Metallothionein 2A (*metallothionein 2A*)
MYC	Myc (*Myc*)
MYCN	N-myc Protoonkogen Protein (*N-myc proto-oncogene protein*)
MYH10	Myosin schwere Kette 10 (*myosin, heavy chain 10*)
MYL12A	Myosin leichte Kette 12A (*myosin, light chain 12A*)
MYO10	Myosin X (*myosin X*)
MYO6	Myosin VI (*myosin VI*)
MYLK	Myosin leichte Kette Kinase (*myosin light chain kinase*) = MLCK
NAMPT	Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*)
NDN	Necdin (*necdin*)
NFAT5	nuklearer Faktor von aktivierten T-Zellen 5 (*nuclear factor of activated T-cells 5*)
NFE2L2	nuklearer Faktor (Erythroid-abgeleitet 2)-artig 2 (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) =Nrf2, NRF2
NFkB	nuklearer Faktor κ leichte Kette-Verstärker von aktivierten B-Zellen (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
NFKB2	nuklearer Faktor κ leicht Polypeptidgenverstärker in B-Zellen 2 (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2*)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*)
NKX2-3	NK2 Homöobox 3 (*NK2 homeobox 3*)
NQO1	NAD(P)H Dehydrogenase 1 (*NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*)
NR1H	nuklearer Rezeptor Subfamilie 1 Gruppe H (*nuclear receptor subfamily 1, group H*)
NR3C1	Glucocorticoidrezeptor (*glucocorticoid receptor*)
NRF2	nuklearer Faktor (Erythroid-abgeleitet 2)-artig 2 (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) = NFE2L2
NRG1	Neuregulin 1 (*neuregulin 1*)

NRL	neural Retina Leuzin Reißverschluss Protein (*neural retina leucine zipper proteine*)
NRTN	Neurturin (*neurturin*)
NTRK1	neurothropische Tyrosin-Kinase Rezeptor Typ 1 (*neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1*)
OCLN	Occludin (*occludin*)
ORM1	Alpha-1-acid Glycoprotein 1 (*Alpha-1-acid glycoprotein 1*)
P38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (*P38 mitogen-activated protein kinases*)
P53	Tumorsuppressorprotein 53 (*tumor protein p53*) =TP53
PAK1	p21 Protein (Cdc42/Rac)-aktivierte Kinase 1 (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1*)
PARP9	Poly (ADP-ribose) Polymerasefamilie Mitglied 9 (*poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9*)
PDGF	Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*)
PEX5L	peroxisomaler Biogenesefaktor 5-atig (*peroxisomal biogenesis factor 5-like*)
PGR	Progesteronrezeptor (*progesterone receptor*)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (*Phosphotidylinositol 3-kinase*)
PKC	Proteinkinase C (*Protein kinase C*)
PKCζ	Proteinkinase C ζ (*Protein kinase C, zeta*)
PLAT	Plasminogenaktivator Gewebe (*plasminogen activator, tissue*)
PLAU	Plasminogenaktivator Urokinase (*plasminogen activator, urokinase*)
PNPLA8	Calcium-unabhängige Phospholipase A2 γ (*Calcium-independent phospholipase A2-gamma*)
POMC	Proopiomelanocortin (*proopiomelanocortin*)
POU5F1	POU-Domäne Klasse 5 Transkriptionsfaktor 1 (*POU domain, class 5, transcription factor 1*)
PPARA	Peroxisomen Proliferator-aktivierender Rezeptor α (*Peroxisome profiferator-activated receptor a*)
PPARG	Peroxisomen Proliferator-aktivierender Rezeptor γ (*Peroxisome profiferator-activated receptor γ*)
PPARGC1A	Peroxisomen Proliferator-aktivierender Rezeptor γ Coaktivator 1α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*)
PPARGC1B	Peroxisomen Proliferator-aktivierender Rezeptor γ Coaktivator 1β (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta*)
PPP1R14A	Proteinphophatase 1 regulierende, inhibierende Untereinheit 14A (*protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A*)
PPP1R15A	Proteinphophatase 1 regulierende, inhibierende Untereinheit 15A (*protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A*)
PPP1R16A	Proteinphophatase 1 regulierende, inhibierende Untereinheit 16A (*protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16A*)
PPP2R5C	Proteinphophatase 1 regulierende Untereinheit Bγ (*protein phosphatase 2, regulatory subunit B', γ*)
PPP3R1	Proteinphophatase 1 regulierende Untereinheit Bα (*protein phosphatase 3, regulatory subunit B, a*)
PRDX2	Peroxiredoxin 2 (*peroxiredoxin 2*)
PRKAA2	Proteinkinase AMP-aktiviert, alpha 2 katalytische Untereinheit (*protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit*)
PRKACA	Proteinkinase cAMP-abhängig, katalytisch α (*protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha*)
PRKCD	Proteinkinase C γ (*protein kinase C, delta)*

PRKCE	Proteinkinase C ε (*protein kinase C, epsilon*)
PTGS2	Prostaglandinsynthase-2 (*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*)
PTK2	Fokale Adhäsion Kinase (*focal adhesion kinase*) = FAK
PTPN6	Protein-Tyrosin-Phosphatase, nicht-Rezeptor Typ 6 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6*)
PTPRJ	Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptor Typ J (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, J*)
PTX3	Pentraxin 3 (*pentraxin 3*)
RAF1	Raf Protoonkogen Serin/Threonine Protein Kinase (*Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine Protein Kinase*)
RAN	*RAN, member RAS oncogene family*
RAR	Retinolsäurerezeptor (*retinoic acid receptor*)
RASGRF1	Ras proteinspezifischer Guaninnukleotid-freisetzender Faktor 1 (*Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1*)
REL	Onkogen Rel (*oncogene Rel*)
RET	ret Protoonkogen (*ret proto-oncogene*)
RHOA	ras-homologe Genfamilie Mitglied A (*ras homolog gene family, member A*)
RLIM	Ringfingerprotein 12 (*ring finger protein 12*)
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase (*Rho-associated protein kinase*)
RPS6KA5	ribolomales Protein S6 Kinase α5 (*ribosomal protein S6 kinase alpha-5*)
RUNX2	Runt-bezogener Transkritionsfaktor 2 (*runt-related transcription factor 2*)
RXRA	Retinoid X Rezeptor α (*retinoid X receptor, alpha*)
S100PBP	S100P-Bindungsprotein (*S100P-binding protein*)
SAMSN1	SH3-SAM Adaptor Protein (*SH3-SAM adaptor protein*)
SASH1	SAM und SH3-enthaltendes Protein 1 (*SAM and SH3 domain containing 1*)
SATB1	SATB Homöobox 1 (*SATB homeobox 1*)
SAV1	Protein salvador Homolog 1 (*protein salvador homolog 1*)
SCAP	SREBF Chaperon (*SREBF chaperone*)
SEPW1	Selenoprotein W1 (*selenoprotein W, 1*)
SERPINB6	Serpin B6 (*serpin B6*)
SFTPA1	Tensidprotein A1 (*surfactant protein A1*)
SGK1	Serine/Threonine-Proteinkinase 1 (*Serine/threonine-protein kinase 1*)
SIRT2	Sirtuin 2 (*sirtuin 2*)
SMAD2	SMAD Familie Mitglied 2 (*SMAD family member 2*)
SMAD3	SMAD Familie Mitglied 3 (*SMAD family member 3*)
SMAD5	SMAD Familie Mitglied 5 (*SMAD family member 5*)
SMARCB1	Integrase Interactor 1 Protein (*integrase interactor 1 protein*)
SNAI2	Snail Homolog 2 (*snail homolog 2*)
SOD	Superoxiddismutase (*superoxide dismutase*)
SOS1	*son of sevenless homolog 1*
SPARC	Osteonectin *(osteonectin)*

SRC	Protoonkogen C-Src (*proto-oncogene c-Src*)
SREBF1	Sterol regulierendes Element bindender Transkriptionsfaktor 1 (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*)
SREBF2	Sterol regulierendes Element bindender Transkriptionsfaktor 2 (*sterol regulatory element binding transcription factor 2*)
SRF	Serum Reaktionsfaktor (*serum response factor*)
SRXN1	Sulfiredoxin 1 (*sulfiredoxin 1*)
SSRP1	strukturspezifisches Erkennungsprotein 1 (*structure specific recognition protein 1*)
STAT1	Signalempfänger und Aktivator von Transkription 1 (*signal transducer and activator of transcription 1*)
STAT2	Signalempfänger und Aktivator von Transkription 2 (signal *transducer and activator of transcription 2*)
STK11	Serin/Threonin-Kinase 11 (*serine/threonine kinase 11*)
STK3	Serin/Threonin-Kinase 3 (*serine/threonine kinase 3*)
SYVN1	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Synovilin (*E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin*)
TAB1	MAP3K7-bindendes Protein 1 (*MAP3K7 binding protein 1*)
TAF4	Transkriptionsinhibitor Faktor TFIID Untereinheit 4 (*transcription initiation factor TFIID subunit 4*)
TANK	TRAF-Familienmitglied-assoziierter NFkB-Aktivator (*TRAF family member-associated NFKB activator*)
TARS	Threonin tRNA Ligase (*threonine tRNA ligase*)
TAZ	Tafazzin (*tafazzin*)
TBX5	T-box 5 (*T-box 5*)
TCF	T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor (*T-cell specific transcription factor*)
TCF7L2	T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor (*T-cell specific transcription factor*)
TFAM	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A (*mitochondrial transcription factor A*)
TFRC	Transferinrezeptor 1 (*transferrin receptor 1*)
TGFA	transformierender Wachstumsfaktor α (*transforming growth factor, alpha*)
TGFB1	transformierender Wachstumsfaktor β1 (*transforming growth factor, beta 1*)
TGFB3	transformierender Wachstumsfaktor β3 (*transforming growth factor, beta 3*)
TGFBI	transformierender Wachstumsfaktor β induziert (*transforming growth factor, beta induced*)
TGFBR1	transformierender Wachstumsfaktor β Rezeptor 1 (*transforming growth factor, beta receptor 1*)
TGM2	Transglutaminase 2 (*transglutaminase 2*)
THBS1	Thrombospondin 1 (*thrombospondin 1*)
TJP3	Tight Junction Protein 3 (*tight junction protein 3*)
TLR9	Toll-like Rezemtor 9 (*toll-like receptor 9*)
TMEM45A	Transmembranprotein 45A (*transmembrane protein 45A*)
TNFRSF1A	Tumornekrosefaktorrezeptor Unterfamilie Mitglied 1 A (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A*)
TNFSF12	Tumornekrosefaktorrezeptor Ligand Unterfamilie Mitglied 12 (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12*)
TNFSF13B	Tumornekrosefaktorrezeptor Ligand Unterfamilie Mitglied 13b (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b*)
TNFα	Tumornekrosefaktorrezeptor α (*tumor necrosis factor alpha*)

TREM1	auslösender Rezeptor exprimierd in Myeloidzellen 1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*)
TRIM24	Triplikat-Motiv-enthaltend 24 (*tripartite motif containing 24*)
TRK	neurotrophische Tyrosinkinase Rezeptor Typ 1 (*Neurotrophic Tyrosine Kinase, Receptor, Type 1*)
TRPC1	transient Rezeptorpotential Kationenkanal 1 (*transient receptor potential cation channel 1*)
TUBB3	Tubulin β3 (*tubulin, beta 3*)
TUBGCP3	Tubulin γ Komplex-assoziiertes Protein 3 (*tubulin, gamma complex associated protein 3*)
TWIST2	Twist-bezogenes Protein 2 (*Twist-related protein 2*)
TXNRD1	Thioredoxinreduktase 1 (*thioredoxin reductase 1*)
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase (*UDP-Glucuronosyltransferase*)
UGT1A6	UDP-Glucuronosyltransferase 1 Polypeptid A6 (*UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6*)
USP51	Ubiquitin-spezifische Peptidase 51 (*ubiquitin specific peptidase 51*)
UTP14A	U3 kleines nukleolar RNA-assoziiertes Protein 14 Homolog A (*U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A*)
VCL	Vinculin (*vinculin*)
VEGFA	vaskulärer Endothelwachstumsfaktor A (*vascular endothelial growth factor A*)
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (*wiskott-aldrich syndrome protein*)
WISP2	WNT1-induzierbares Signalprotein 2 (*WNT1 inducible signaling pathway protein 2*)
Wnt	WNT Protein (*Wnt protein*)
WWTR1	WW-Domäne-beinhaltender Transkriptionsregulator 1 (*WW domain containing transcription regulator 1*)
XBP1	X-Box-Bindungsprotein 1 (*X-box binding protein 1*)
ZC3H12C	Zinkfinger CCCH-typ-enthaltend 12C (*zinc finger CCCH-type containing 12C*)
ZFP3	ZFP3 Zinkfingerprotein (*ZFP3 zinc finger protein*)
ZYX	Zyxin (*zyxin*)

Nanopartikeleigenschaften der Literatur

Tabelle A1: Übersicht über einige Eigenschaften der Silbernanopartikel aus der Literatur, die in der Diskussion zitiert wurde.

Quelle	Beschichtung / Stabilisierung	TEM	Größe der Partikel DLS	sonstige	Ionenfreisetzung
[Ahamed *et al.*, 2008] ([Schrand *et al.*, 2008])	Gummi Arabikum	27,5 ± 9,1 nm	384 nm in Ham's F12 DMEM + 10 % FCS	—	—
	Kohlenwasserstoffe	26,0 ± 8,4 nm	278 nm in Ham's F12 DMEM + 10 % FCS	—	—
[AshaRani *et al.*, 2009]	Stärke	6 bis 20 nm	—	—	—
[Badawy *et al.*, 2010]	unbeschichtet	58 ± 11 nm	25 nm in Wasser	—	—
	Citrat	19 ± 5 nm	10 nm in Wasser	—	—
	PVP	72 ± 24 nm	200 nm in Wasser	—	—
	verzweigtes Polyethylenimin	10 ± 4 nm	11 nm in Wasser	—	—
[Beer *et al.*, 2012]	BSA	15,9 ± 7,6 nm bis 19,8 ± 10,7 nm			2,6 bis 5,9 % Ag^+ in Wasser
	PVP	69 ± 49 nm			39 bis 69 % Ag^+ in Wasser
[Bouwmeester *et al.*, 2011]	—	31 ± 5 nm	—	149 ± 6 nm	17,5 % Ag^+
		30 ± 4 nm		175 ± 7 nm	15,8 % Ag^+
		69 ± 7 nm		214 ± 9 nm	5,8 % Ag^+
		112 ± 9 nm		233 ± 6 nm NTA nach 24 h in DMEM + 10 % FCS	7,6 % Ag^+ in DMEM + 10 % FCS
[Carlson *et al.*, 2008]	Kohlenwasserstoffe	15 nm	—	—	—
		30 nm			
		55 nm			
[Cha *et al.*, 2008]	—	13 nm	—	—	—
[Comfort *et al.*, 2011]	—	9,15 ± 1,5 nm	84,66 ± 1,9 nm in DMEM + 10 % FCS	—	—
[Deng *et al.*, 2010]	PVP	69 ± 3 nm	siehe [Foldbjerg *et al.*, 2009]	—	—
[Eom und Choi, 2010]	Tetrahydrofuran	5 bis 10 nm	28 bis 35 nm in RPMI + 10 % FCS	—	—
[Foldbjerg *et al.*, 2009] [Foldbjerg *et al.*, 2011]	PVP	69 ± 49 nm	121 ± 6 nm nach 24 h in Wasser 859 ± 197 nm nach 24 h in serumfreiem RPMI 149 ± 37 nm nach 24 h in RPMI + 1 % FCS	—	—

Quelle	Beschichtung / Stabilisierung	Größe der Partikel			Ionenfreisetzung
		TEM	DLS	sonstige	
[Foldbjerg *et al.*, 2012]	BSA	15,9 ± 7,6 nm	38,7 ± 23 nm nach 24 h in DMEM + 2,5 % FCS	---	4,99 % Ag^+
[Gaiser *et al.*, 2012]	---	---	34,16 ± 8,1 nm 473 ± 120 nm in DMEM + 10 % FCS	---	<1 % Ag^+ <1 % Ag^+ nach 48 h in DMEM + 10 % FCS
[Gaiser *et al.*, 2013]	Tween 20 und Tagat TO (NM300)	17 ± 3,3 nm	114 nm in MEM + 10 % FCS 137,7 nm in Williams E Medium + 5 % FCS	---	bis 0,47 % Ag^+ für 128 µg/mL nach 24 h in MEM + 10 % FCS
[Gopinath *et al.*, 2010]	DMEM	ca. 18 nm	---	---	---
[Greulich *et al.*, 2011]	PVP	---	75 ± 20 nm in Wasser	70 ± 20 nm SEM	---
[Haase *et al.*, 2011] [Haase *et al.*, 2012]	Peptid CKK	---	27,0 ± 5,0 nm in Wasser	18,8 ± 3,08 nm SAXS in Wasser	---
[Kang *et al.*, 2012a] [Kang *et al.*, 2012b]	---	7,5 ± 2,5 nm	---	---	---
[Kawata *et al.*, 2009]	Polyethylenimin	---	---	7 bis 10 nm Methode? (Polysterennanopartik el: 15 nm Methode?)	---
[Kermanizadeh *et al.*, 2012a] [Kermanizadeh *et al.*, 2012b]	Tween 20 und Tagat TO (NM300)	17 ± 3,3 nm	114 nm in MEM + 10 % FCS 137,7 nm in Williams E Medium + 5 % FCS	---	bis 0,47 % Ag^+ für 128 µg/mL nach 24 h in MEM + 10 % FCS
[Kim *et al.*, 2008]	Carboxymethyl- zellulose	---	---	52,7 bis 70,9 nm Methode?	---
[Kim *et al.*, 2009a] [Kim *et al.*, 2009b]	---	5 bis 10 nm	---	---	---
[Kim *et al.*, 2010a]	---	ca. 50 nm	---	---	---
[Kim *et al.*, 2010b]	Carboxymethyl- zellulose	56 ± 1,46 nm	---	---	---
[Kittler *et al.*, 2010]	PVP	50 ± 20 nm	umfangreiche Daten siehe [Kittler *et al.*, 2010]	---	---
	Citrat	50 ± 20 nm		---	---
[Kvitek *et al.*, 2008]	Tween 80	26 nm	---	---	---
	PVP 360	26 nm	---	---	---
[Lee *et al.*, 2011]	---	---	480 nm in serumfreiem DMEM	---	---

Quelle	Beschichtung / Stabilisierung	Größe der Partikel TEM	Größe der Partikel DLS	sonstige	Ionenfreisetzung
[Lee *et al.*, 2012]	Citrat	7,9 ± 0,95 nm	---	---	---
[Teodoro *et al.*, 2011]	---	41,71 ± 6,28 nm 82,44 ± 24,74 nm	53,2 nm 174 nm in Wasser	---	---
[Lim *et al.*, 2012]	PVP	---	3,67 nm 96,7 nm in RPMI + 10 % FCS	---	---
[Lin *et al.*, 2012b]	Polyoxyethylenimid	15,91 ± 1,43 nm	60,8 ± 16,2 nm	---	---
	Polyvinylalcohol	20,13 ± 1,65 nm	1,5 ± 9,7 nm	---	---
[Liu und Hurt, 2010]	Citrat	4,8 ± 1,6 nm	---	---	siehe Quelle
[Liu *et al.*, 2010]	PVP	5,9 ± 3,3 nm 23,8 ± 6,7 nm 47,5 ± 22,1 nm	---	---	< 1 % Ag^+ in DMEM und RPMI 1640 + 10 % FCS
[Loeschner *et al.*, 2011]	PVP	14 ± 2 nm	---	---	11 % Ag^+ in Wasser
[Nowrouzi *et al.*, 2010]	---	---	---	5 bis 10 nm Methode?	---
[Otero-González *et al.*, 2012]	PVP	---	171 ± 2 nm in MEM + 5 % FCS	---	---
[Park *et al.*, 2010]	FCS	68,9 nm	---	---	---
[Park *et al.*, 2011]	Citrat	7,9 ± 0,95 nm	---	---	---
[Römer *et al.*, 2011]	Citrat	---	25 nm 27 nm 42 nm in Wasser	---	---
{Stoehr 2011 #48	PVP	30 nm Stäbchen: 102 nm x 6,5 µm 132 nm x 12 µm	---	---	<10 mg/L
[Sur *et al.*, 2012]	Citrat	---	79 ± 1 nm in Wasser	---	---
	Lactose		88 ± 1 nm in Wasser	---	---
	Oligonucleotide		94 ± 1 nm in Wasser	---	---

Quelle	Beschichtung / Stabilisierung	Größe der Partikel TEM	Größe der Partikel DLS	Größe der Partikel sonstige	Ionenfreisetzung
[Suresh *et al.*, 2012]	Poly(diallyldimethyl-ammonium)	4,5 ± 1,5 nm	164 nm in RPMI + 10 % FCS	---	0,045 µg/mL Ag^+
	Proteine und Peptide	4,0 ± 1,5 nm	103,6 nm in RPMI + 10 % FCS		0,015 µg/mL Ag^+
	unbeschichtet	9,0 ± 2 nm	137,8 nm in RPMI + 10 % FCS		0,011 µg/mL Ag^+
	Ölsäure	4,0 ± 1 nm	77,2 nm in RPMI + 10 % FCS		0,01 µg/mL Ag^+
[von der Zande *et al.*, 2012]	Tween 20 und Tagat TO (NM300)	17 ± 3,3 nm	59 nm	---	ca. 7 %
	PVP	12,1 ± 8,0 nm	49 nm	---	6 bis 45 % Ag^+ mit der Zeit steigend

andere Nanopartikel:

Quelle	Beschichtung / Stabilisierung	Größe der Partikel TEM	Größe der Partikel DLS	Größe der Partikel sonstige
[Hillyer und Albrecht, 2001] Gold nanopartikel	---	4 ± 0,8 nm 10 ± 2 nm 28 ± 8 nm 58 ± 16 nm	---	---
[Jahn *et al.*, 2012] Eisenoxidnanopartikel	Polymaltose	1,3 bis 4,1 nm	9 ± 1 nm	---
	Dextran	2,8 bis 7,0 nm	12 ± 1 nm	---
	Glucoronsäure und Sucrose	1,1 bis 3,6 nm	7 ± 1 nm	---
	Sucrose	1,7 bis 5,2 nm	7 ± 1 nm	---
	PAA	5,2 bis 18,5 nm	39 ± 4 bis 74 ± 7 nm	---
[Lin *et al.*, 2012a] Goldnanopartikel	Polyethylenglycol	alle ca. 5,5 nm	---	---
	Poly-2,3-hydroxy-ropylacrylamid		---	---
	Poly-2-aminoethylacrylamid		---	---
	Poly-N-isopropylacrylamid		---	---
	PAA		---	---
{Maiorano 2010 #187 Goldnanopartkel	Citrat	15 nm 40 nm 80 nm	17,7 ± 2,2 nm 42,9 ± 6,2 nm 82,3 ± 15,6 nm in Wasser	---

Tabelle A2: Übersicht über einige Eigenschaften der Nanopartikel aus der Literatur, die in der Diskussion zitiert wurde.

TEER-Messung und FITC-Dextran Durchtritt im Transwell®

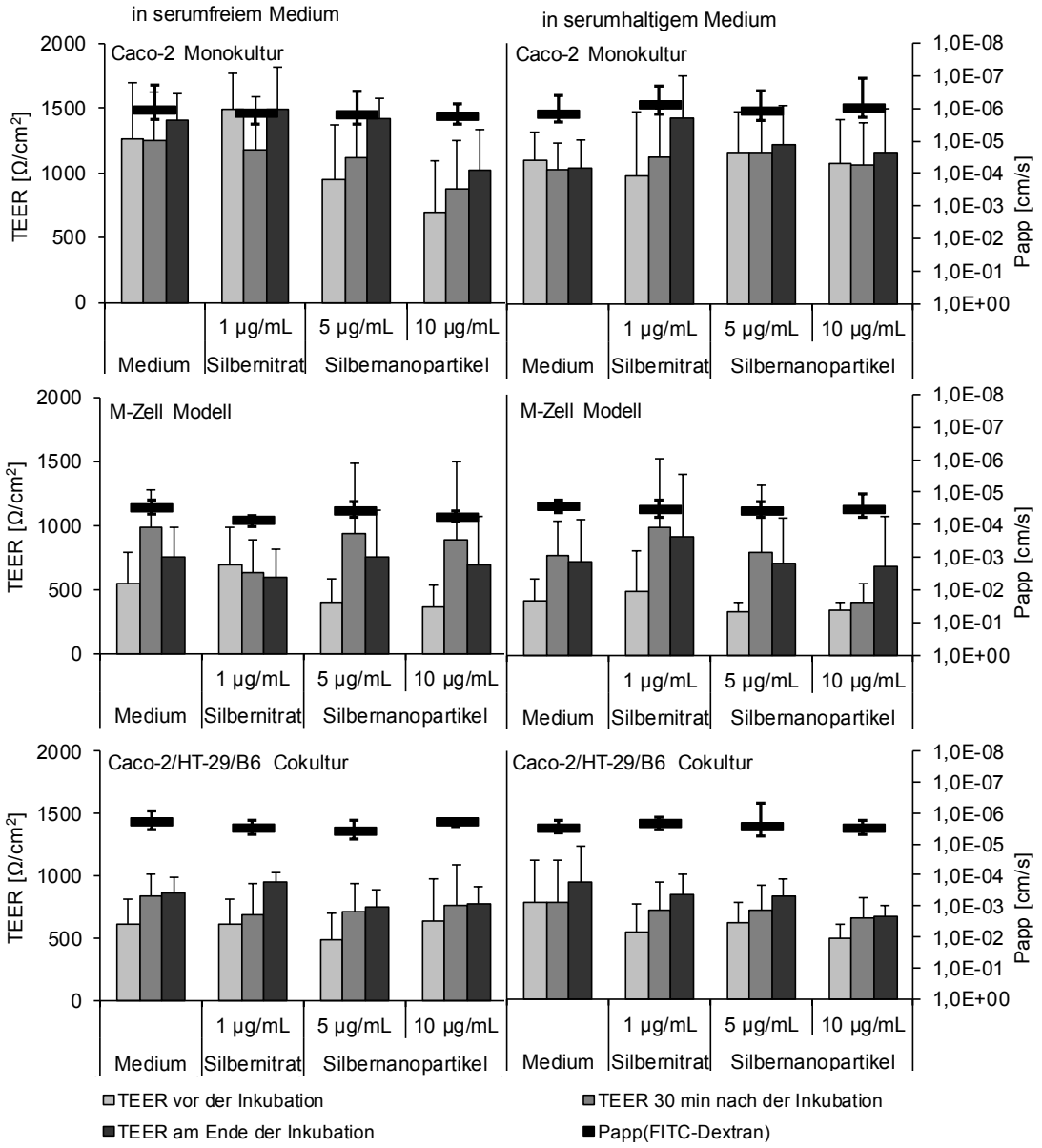

Abbildung A1: Messungen des TEER und des Fluorescein-Dextran Durchtritts der mit verschiedenen Silberspezies inkubierten Transwells®. Die Caco-2 Monokultur sowie die Cokultur mit Raji und HT-29/B6 Zellen wurden im Transwell®-System für 24 h mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silberionen inkubiert und der Durchtritt an Silber gemessen. Die Integrität des Monolayers wurde mittels TEER Messung und der P_{app} von Fluorescein-Dextran bestimmt.

Tabelle A3: Tabellarische Übersicht über den Vergleich der Ergebnisse des PCR-Arrays und des Micro-Arrays. Für die Transkriptomanalysen wurden differenzierte Caco-2 Zellen 24 h mit Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und Silberionen inkubiert. Dabei wurde der Micro-Array und der PCR-Array (1) mit derselben RNA durchgeführt, während im PCR-Array (2) die RNA eines biologischen Replikates eingesetzt wurde. Rot markierte Felder kennzeichnen eine Erhöhung und grüne Felder eine Reduzierung der Genexpression im Vergleich zur Mediumkontrolle (*Fold Change* ≤ 1,4 und *Student`s* t-Test mit $p < 0,05$).

	Stress und Entzündung	zelluläre Morphologie und Bewegung	Zelltot und Apoptose	Zellzyklus und Proliferation	Zell-Zell Kommunikation und zelluläre Signalwege	Calcium	Silbernanopartikel								Silberionen	
							Micro-Array	PCR-Array (1) 2,5 µg/mL	PCR-Array (2)	PCR-Array (2) 5 µg/mL	PCR-Array (2) 10 µg/mL	Micro-Array	PCR-Array (1) 25 µg/mL	PCR-Array (2)	Micro-Array 0,5 µg/mL	PCR-Array (1)
ACTB	X	X	X	X	X					3,7				5,0		
ACTG2		X										2,7	2,1	-2,1		
ACTN2		X			X						145,0	3,0	156,3	60,9		
ACTN4	X	X	X	X						11,7		2,1	4,4	15,5		
ALB	X	X	X	X	X							-4,7	-4,7		-1,5	
ASAP1		X			X					9,9		1,8	5,9	14,2		
ATF3	X	X	X	X	X				1,9		13,3	3,4	3,5	2,0		
B2M	X	X	X	X	X				1,6		1,7	-1,6	-5,8			
BAG3	X	X	X							1,8	16,7	3,9	7,8	7,3		
BCL10		X	X	X	X					-2,7	1,0	-2,8		-2,5		
BCL2L11	X	X	X	X	X					-2,8		-2,6	-3,2		-1,6	
BDNF	X	X	X	X	X							2,3	6,5	3,3		
BRAF		X	X	X	X					2,4		-4,4				
CAPN10			X			X				17,8		-2,1	4,0	11,9		
CAPN3		X	X			X				6,0		-2,2		3,1		
CAT	X	X	X	X	X					4,8		-3,0		1,6		
CCT5	X		X	X								2,3				
CDKN1A	X	X	X	X	X						7,1	2,0	2,3			
COL5A2										2,6		-5,1				
CTNND1		X		X	X					10,6		-2,0	2,2	9,7		
CTTN	X	X	X	X						44,5		-1,3	8,7	49,2		
CUX1		X	X	X			1,5			4,7			2,7	4,9		
CYFIP2			X					1,9				-2,6				
CYR61	X	X	X	X	X					14,0		3,5	16,3	62,8		
DAPK1			X	X		X				-2,1	-5,2	-2,1	-3,0	-5,3		
DIDO1		X	X	X			1,6			11,9			2,5	9,4		
DNAJB6	X	X	X	X						4,3	11,6	2,6	5,8	7,1		
DOCK1		X	X							2,8		-2,0	1,7	1,6		
DUSP1	X	X	X	X	X					6,4	142,7	3,7	16,4	66,1		
DUSP2	X		X	X					93,3	74,4	619,0	3,9	11,4	403,8		
DUSP4			X	X						13,1		3,7	23,1	69,5		
DUSP6		X	X	X						12,4		4,7	14,8	31,6		
DUSP9			X	X						2,3		-2,9	-5,1			
EGR1		X	X	X	X							4,4	4,9			
EPHX2	X		X	X						2,7		-4,3	11,1			
ETS1	X	X	X	X	X							2,7	31,3			
EXT1							1,6			-2,5		2,0		-2,6		
FAM129A	X						1,7			8,5		2,2	9,6	6,2		
FN1	X	X	X	X	X					6,0	2,3	2,0	3,0	9,1		
FOS	X	X	X	X	X					12,7		6,0	21,9	118,1		
FOSB	X		X	X						8,7		2,6	23,5	27,6		
FOSL1		X	X	X	X					3,4	433,4	7,8	99,8	106,8		

Tabelle A4: Tabellarische Übersicht über den Vergleich der Ergebnisse des PCR-Arrays und des Micro-Arrays. Fortsetzung der vorherigen Seite.

	Stress und Entzündung	zelluläre Morphologie und Bewegung	Zelltot und Apoptose	Zellzyklus und Proliferation	Zell-Zell Kommunikation und zelluläre Signalwege	Calcium	Silbernanopartikel								Silberionen	
							Micro-Array	PCR-Array (1) 2,5 µg/mL	PCR-Array (2)	PCR-Array (2) 5 µg/mL	PCR-Array (2) 10 µg/mL	Micro-Array	PCR-Array (1) 25 µg/mL	PCR-Array (2)	Micro-Array 0,5 µg/mL	PCR-Array (1)
GADD45B	X		X	X						-2,2	7,7	3,6	4,6	2,4		
GSTA1	X		X									-2,4				
GSTA4	X											-2,0		-2,2		
HMOX1	X	X	X	X	X				84,2	22,0	649,1	17,2	45,7	277,9		
HSPA1A	X	X	X	X	X				2,6		18,6	5,6	20,7	6,3		
HSPA6	X								14,0		240,3	106,8	296,0	42,7		
HSPH1			X		X					-2,0	7,6	3,3	5,2	2,2		
IGFBP7	X	X		X	X							-1,9				
ITGA2		X	X	X	X					14,6		2,9	15,3	47,7		
JMJD1C										4,6			2,5	5,6		
JUN	X	X	X	X	X					49,2		4,2	31,3	265,9		
MAP1A									1,9		8,9	3,2	4,1	3,4		
MCL1	X	X	X	X							1,3	3,0				
MMP1	X	X	X	X	X							7,6	11,3	6,4		
MMP10	X	X		X						2,7		5,3	17,5	17,7		
MMP11		X	X	X								-2,0	-5,7			
MMP7		X	X	X	X						12,0	2,8	8,4	2,0		
MPHOSPH8							0,4	1,5		5,1	2,2	-1,2	4,2			
MT1F	X	X	X				-1,9		16,1		53,2	12,2	18,3	19,6		
MT1G	X						-1,7		29,9		299,9	11,9	191,5	248,5		
MT1H	X	X	X	X			-1,8	-2,4	30,0		148,6	14,2	96,6	88,7		
MT1M	X								110,7		536,0	43,6	523,4	209,3		
MT1X	X		X	X			-2,3	-2,2	83,0		414,0	9,5	51,6	273,2	-1,6	-2,8
MT2A	X	X	X	X			-2,1	-2,3	8,0		36,5	7,7	22,5	17,8		
MYL12A	X										1,8					
MYLK	X	X	X	X		X				-2,3		-2,3				
PAK1		X	X	X	X							-2,1		-2,2		
PPARA	X	X	X	X	X					6,4	3,7	-1,9		2,6	-1,5	
PPARG	X	X	X	X	X							-2,1				
PPP1R14A												-2,9				
PPP1R15A		X	X	X	X					26,8		3,0	21,5	125,1		
PPP1R16A										14,0		-2,8	2,0	10,3		
PPP2R5C		X	X	X						1,5		-2,5				
PRDX2	X	X	X	X					23,1	24,7	18,3	2,0		16,7		
PTK2		X	X	X	X					5,4		-3,3	2,8	4,6		
RXRA	X	X	X	X	X							-3,0	-2,4			
SOS1		X		X						3,2	2,3	2,0	2,5	1,8		
SPARC	X	X	X	X	X	X			4,6	5,5	2,9	-2,2		4,9		
SRXN1	X	X	X							24,3		6,0	42,7	106,6		
TCF7L2	X	X	X	X								1,5				
TGFBI		X	X	X	X					2,3		-2,5				
THBS1	X	X	X	X	X					2,7	5,9	2,2	8,0	3,3		
TUBB3	X	X	X	X						41,6		2,2	79,0	349,7		
TUBGCP3										6,5	8,5	-1,2	5,5	5,4		
TXNRD1	X		X	X	X						4,7	3,5	3,6			
VCL	X	X	X	X	X						2,5	2,3	2,3			
ZYX	X	X	X	X	X					7,0			8,4	14,8		

Ingenuity Pathway Analyse

In den folgenden Tabellen und Abbildungen ist eine Auswahl der Ergebnisse der Stoffwechselweganalyse mittels *Ingenuity Pathway Analyse* (IPA) *Software* dargestellt, die auf Grundlage der Micro-Array Daten von differenzierten Caco-2 Zellen, die mit 2,5 und 25 µg/L Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln und 0,5 µg/mL Silberionen als Silbernitrat 24 h inkubiert wurden, durchgeführt wurde. Für die Auswertung der differenziellen Genexpressionslisten im Vergleich zur Mediumkontrolle wurde ein *Fold Change* von mindestens 1,4 und ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt. Rote Markierungen kennzeichnen eine Hochregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle und grüne Markierungen eine Runterregulation der Genexpression im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Das Programm gibt auf der Grundlage der im Datenset regulierten Gene sowie umfangreicher Datenbanken und Literatur im Folgenden aufgeführte, verschiedene Vorhersagen. Die Netzwerke (*Networks*) geben einen Eindruck von Wechselwirkungen der in der Genexpression regulierten Proteine. Unter der Überschrift molekulare und zelluläre Funktionen (*Bio Function – Molecular and Cellular Functions*) werden Vorhersagen für die Störung von molekularen Funktionen oder das Auftreten von zellulären Ereignissen getroffen. Die Katergorie Stoffwechselwege (*Canonical Pathways*) listet bekannte Stoffwechselwege auf, deren Teilnehmer in dem Analyseset vertreten sind und gibt über den *p-value* und den *Ratio* einen Eindruck von der Relevanz des Stoffwechselweges. Unter den am stärksten regulierten Molekülen (*Top Molecules*) sind die 10 am stärksten regulierten Gene des betrachteten Datensets gelistet. Die Kategorie vorgeschaltete Regulatoren (*Upstream Regulators*) ermöglicht die Betrachtung von Reaktionskaskaden und der transkriptionalen Regulation der beteiligten Moleküle. [ingenuity.com, 2013]

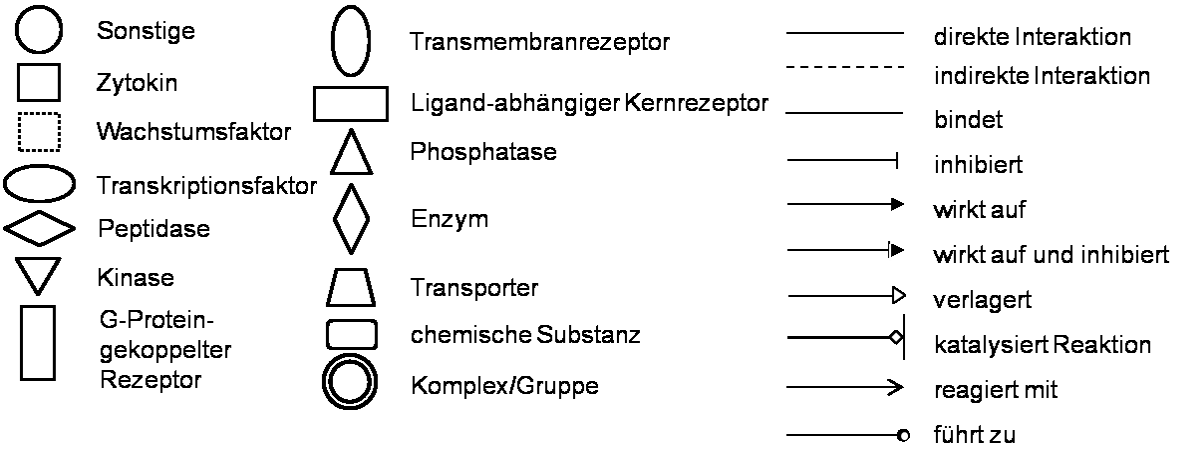

Abbildung A2: Legende für die nachfolgenden Abbildungen aus der IPA Analyse der Micro-Array Daten.

2,5 µg/mL Silbernanopartikel

Networks

Associated Network Function	Score
Organ Morphology, Renal and Urulogical System Development and Function, Cell Death and Survival	109

Bio Function – Molecular and Cellular Functions

Category	Function Annotation	p-value	Predicted Activation (z-score)	#Molecules
Molecular Transport	Quantity of metal	$3{,}71 \cdot 10^{-2}$	Increased (2,219)	5

Canonical Pathways

Name	p-value	Ratio
Formaldehyde Oxidation II (Glutathione-dependant)	$6{,}51 \cdot 10^{-3}$	1/10 (0,1)
Netrin Signaling	$7{,}13 \cdot 10^{-3}$	2/57 (0,035)
Calcium Transport I	$2{,}90 \cdot 10^{-2}$	1/13 (0,077)
Methylglyoxal Degradation III	$3{,}53 \cdot 10^{-2}$	1/23 (0,043)
Paerinson`s Signaling	$4{,}79 \cdot 10^{-2}$	1/16 (0,062)

Top Molecules

Molecules up-regulated	Exp. Value
FAM129A	1,736
ZC3H12C	1,693
DIDO1	1,618
FRY	1,560
CLGN	1,556
CTAGE5	1,519
FAM208B	1,515
MPHOSPH8	1,512
ZFP3	1,509
ATP2C2	1,506

Molecules down-regulated	Exp. Value
MT1X	-2,411
MT2A	-2,144
MT1F	-1,901
MT1H	-1,818
MT1E	-1,735
MT1G	-1,709
SEPW1	-1,591
FAM171B	-1,521
UGT1A6	-1,498
NFAT5	-1,496

Upstream Regulators

Upstream Regulator (Molecule Type)	Fold Change	Predicted Action State (z-score)	p-value of overlap	#Target molecules
IFNA2 (cytokine)	-1,037	Inhibited (-2,214)	$2{,}62 \cdot 10^{-4}$	5

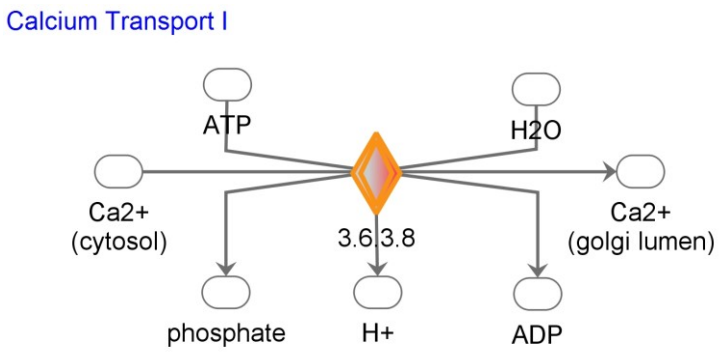

Abbildung A3: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Calcium Trnasport I*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 2,5 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

25 µg/mL Silbernanopartikel

Networks

Associated Network Function	Score
RNA Post-Transcriptional Modification, Post Transclational Modification, Embryonic Development	94
Behavior, Neurological Disease, DNA Replication, Recombination, and Repair	89
Cell Cycle, Carbohydrate Metabolism, Lipid Metabolism	85
Post-Translational Modification, Drug Metabolism, Lipid Metabolism	83
RNA Post-Transcriptional Modification, Molecular Transport, RNA Trafficking	79
Gene Expression, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry	79
Protein Degradation, Protein Synthesis, Antimicrobial Response	77
DNA Replication, Recombination, and Repair, Gene Expression, Cell Cycle	72
Cell Death and Survival, RNA Post-Transcriptional Modification, Renal Necrosis/Cell Death	69
Gene Expression, Infectious Disease, Cancer	68

Bio Function – Molecular and Cellular Functions

Category	Function Annotation	p-value	Predicted Activation (z-score)	#Molecules
Cell Death and Survival	Cell death	$9{,}79 \cdot 10^{-5}$	Decreased (-4,457)	1134
Cell Death and Survival	apoptosis	$1{,}29 \cdot 10^{-5}$	Decreased (-3,892)	930
Cell Death and Survival	necrosis	$4{,}30 \cdot 10^{-4}$	Decreased (-3,818)	866
Cell Death and Survival	Cell death of tumor cell lines	$1{,}60 \cdot 10^{-6}$	Decreased (-3,021)	519
Cell Death and Survival	Apoptosis of tumor cell lines	$2{,}80 \cdot 10^{-5}$	Decreased (-2,979)	424
Cell Death and Survival	Cell death of epithelial cells	$1{,}22 \cdot 10^{-3}$	Decreased (-2,386)	160
Cell Death and Survival	Cell deth of connective tissue cells	$4{,}04 \cdot 10^{-4}$	Decreased (-2,348)	237
Cell Death and Survival	Apoptosis of fibroblasts	$1{,}40 \cdot 10^{-2}$	Decreased (-2,348)	74
Small Molecule Biochemistry / Lipid Metabolism	Glycosylation of glycosphingolipid	$2{,}17 \cdot 10^{-2}$	Decreased (-2,201)	5
Cellular Development	Adipogenesis of cells	$2{,}11 \cdot 10^{-2}$	Decreased (-2,195)	32
Protein Synthesis / Antigen Presentation	Quantity of MHC Class I on cell surface	$8{,}07 \cdot 10^{-3}$	Decreased (-2,194)	5
Cell Death and Survival	Cell death of epithelial cell lines	$1{,}88 \cdot 10^{-3}$	Decreased (-2,156)	107
Protein Synthesis / Drug Metabolism	Synthesis of glutathione	$2{,}13 \cdot 10^{-2}$	Increased (2,000)	8
Cell Cycle	Re-entry into interphase	$2{,}09 \cdot 10^{-2}$	Increased (2,043)	17
Cellular Growth and Proliferation	Colony forming of prostate cancer cell lines	$1{,}89 \cdot 10^{-2}$	Increased (2,109)	12

Category	Function Annotation	p-value	Predicted Activation (z-score)	#Molecules
Protein Synthesis	Translation of protein	$1{,}51 \cdot 10^{-2}$	Increased (2,326)	76
Cell Cycle	S phase	$4{,}01 \cdot 10^{-4}$	Increased (2,397)	110
Cell Cycle	Entry into S phase	$8{,}89 \cdot 10^{-3}$	Increased (2,517)	54
Cell Cycle	Entry into interphase	$1{,}30 \cdot 10^{-2}$	Increased (2,641)	58
Cellular Growth and Proliferation / Cellular Development / Connective Tissue Development and Function	Proliferation of fibroblast cell lines	$2{,}64 \cdot 10^{-3}$	Increased (2,685)	157
Cellular Assembly and Organization	Association of chromatin	$2{,}13 \cdot 10^{-2}$	Increased (2,791)	8
Cellular Growth and Proliferation	Proliferation of cells	$7{,}63 \cdot 10^{-4}$	Increased (2,857)	1189

Canonical Pathways

Name	p-value	Ratio
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	$1{,}87 \cdot 10^{-5}$	75/192 (0,391)
FAK Signaling	$3{,}55 \cdot 10^{-5}$	42/101 (0,416)
Integrin Signaling	$1{,}42 \cdot 10^{-4}$	78/207 (0,377)
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	$4{,}84 \cdot 10^{-4}$	29/66 (0,439)
Cyclins and Cell Cycle Regulation	$8{,}52 \cdot 10^{-4}$	35/89 (0,393)
ERK / MAPK Signaling	$9{,}07 \cdot 10^{-4}$	71/206 (0,345)
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	$1{,}56 \cdot 10^{-3}$	60/164 (0,366)
Estrogen-mediated S-phase Entry	$1{,}84 \cdot 10^{-3}$	14/28 (0,5)
ILK Signaling	$2{,}14 \cdot 10^{-3}$	69/192 (0,359)
Epithelial Adherens Junction Signaling	$2{,}25 \cdot 10^{-3}$	56/147 (0,381)
Assembly of RNA Polymerase I Complex	$2{,}84 \cdot 10^{-3}$	7/13 (0,538)
Non-Small Cell Lung Cancer Signaling	$3{,}22 \cdot 10^{-3}$	29/79 (0,367)
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	$3{,}56 \cdot 10^{-3}$	31/85 (0,365)
Triaylglycerol Biosynthesis	$3{,}77 \cdot 10^{-3}$	17/46 (0,37)
Chronic Myeloid Leukemia Signaling	$4{,}35 \cdot 10^{-3}$	38/105 (0,362)
Tight Junction Signaling	$5{,}35 \cdot 10^{-3}$	57/161 (0,354)
P53 Signaling	$5{,}39 \cdot 10^{-3}$	38/96 (0,396)
Telomerase Signaling	$5{,}46 \cdot 10^{-3}$	39/103 (0,379)
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis II	$7{,}98 \cdot 10^{-3}$	6/18 (0,333)
Arginine Biosynthesis IV	$8{,}07 \cdot 10^{-3}$	5/24 (0,208)
Paxilin Signaling	$8{,}16 \cdot 10^{-3}$	39/111 (0,351)
Protein Ubiquitination Pathway	$8{,}2 \cdot 10^{-3}$	88/268 (0,328)
Regulation of Actin-based Motility by Rho	$9{,}58 \cdot 10^{-3}$	33/89 (0,371)
HGF Signaling	$9{,}88 \cdot 10^{-3}$	39/105 (0,371)
Dopamine Degradation	$1{,}03 \cdot 10^{-2}$	11/37 (0,297)
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	$1{,}06 \cdot 10^{-2}$	62/195 (0,318)
Xenobiotic Metabolism Signaling	$1{,}15 \cdot 10^{-2}$	88/299 (0,294)
Production of Nitric Oxide and ROS in Macrophages	$1{,}17 \cdot 10^{-2}$	64/210 (0,305)
Glioma Signaling	$1{,}19 \cdot 10^{-2}$	37/112 (0,33)
Choline Biosynthesis III	$1{,}21 \cdot 10^{-2}$	8/22 (0,364)
Actin Cytoskeleton Signaling	$1{,}24 \cdot 10^{-2}$	74/238 (0,311)
Prostate Cancer Signaling	$1{,}43 \cdot 10^{-2}$	32/98 (0,327)

Name	p-value	Ratio
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	$1{,}57 \cdot 10^{-2}$	23/72 (0,319)
RAN Signaling	$1{,}67 \cdot 10^{-2}$	9/24 (0,3759
Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	$1{,}67 \cdot 10^{-2}$	9/29 (0,31)
IGF-1 Signaling	$1{,}72 \cdot 10^{-2}$	37/105 (0,352)
GADD45 Signaling	$2{,}08 \cdot 10^{-2}$	10/22 (0,455)
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	$2{,}08 \cdot 10^{-2}$	26/68 (0,382)
Neurotropin / TRK Signaling	$2{,}1 \cdot 10^{-2}$	27/75 (0,36)
Sucrose Degradation V (Mammalian)	$2{,}17 \cdot 10^{-2}$	5/19 (0,263)
D-glucuronate Degradation I	$2{,}22 \cdot 10^{-2}$	3/13 (0,231)
ErbB2-ErbB3 Signaling	$2{,}5 \cdot 10^{-2}$	23/60 (0,383)
Renal Cell Carcinoma Signaling	$2{,}57 \cdot 10^{-2}$	27 /75 (0,365)
Ethanol Degradation IV	$2{,}68 \cdot 10^{-2}$	9/29 (0,31)
Cysteine Biosynthesis III (mammalia)	$2{,}68 \cdot 10^{-2}$	9/30 (0,3)
Histamine Degradation	$2{,}73 \cdot 10^{-2}$	7/29 (0,241)
Melanoma Signaling	$2{,}86 \cdot 10^{-2}$	18/46 (0,391)
Molecular Mechanism of Cancer	$3{,}12 \cdot 10^{-2}$	110/378 (0,291)
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	$3{,}17 \cdot 10^{-2}$	47/161 (0,292)
Oxidative Ethanol Degradation III	$3{,}46 \cdot 10^{-2}$	8/40 (0,2)
Methionine Degradation I (to Homocysteine)	$3{,}46 \cdot 10^{-2}$	8/23 (0,348)
PAK Signaling	$3{,}51 \cdot 10^{-2}$	33/106 (0,311)
Apoptosis Signaling	$3{,}51 \cdot 10^{-2}$	33/95 (0,347)
HER-2 Signaling in Breast Cancer	$3{,}68 \cdot 10^{-2}$	29/80 (0,362)
Prolactin Signaling	$372 \cdot 10^{-2}$	28/80 (0,35)
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	$3{,}8 \cdot 10^{-2}$	22/57 (0,386)
ERK5 Signaling	$3{,}81 \cdot 10^{-2}$	24/65 (0,369)
Ethanol Degradation II	$4{,}03 \cdot 10^{-2}$	13/43 (0,302)
Valine Degradation I	$4{,}04 \cdot 10^{-2}$	9/35 (0,257)
RhoA Signaling	$4{,}1 \cdot 10^{-2}$	41/120 (0,342)
Virus Entry via Endocytic Pathway	$4{,}11 \cdot 10^{-2}$	33/99 (0,333)
Acute Phase Response Signaling	$4{,}12 \cdot 10^{-2}$	57/178 (0,32)
Interferon Signaling	$4{,}21 \cdot 10^{-2}$	14/36 (0,389)
TGF-β Signaling	$4{,}24 \cdot 10^{-2}$	31/98 (0,348)
PDGF Signaling	$4{,}36 \cdot 10^{-2}$	29/85 (0,341)
Citrulline Biosynthesis	$4{,}45 \cdot 10^{-2}$	5/26 (0,192)
Small Cell Lung Cancer Signaling	$4{,}47 \cdot 10^{-2}$	27/89 (0,303)
Cholesterol Biosynthesis I	$4{,}5 \cdot 10^{-2}$	7/40 (0,175)
Dermatan Sulfate Degradation (Metazoa)	$4{,}5 \cdot 10^{-2}$	7/23 (0,304)
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	$4{,}5 \cdot 10^{-2}$	7/40 (0,175)
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	$4{,}5 \cdot 10^{-2}$	7/40 (0,175)
Polyamine Regulation in Colon Cancer	$4{,}5 \cdot 10^{-2}$	10/29 (0,345)
GDNF Family Ligand-Receptor Interaction	$4{,}52 \cdot 10^{-2}$	26/73 (0,356)
Serotonin Degradation	$4{,}6 \cdot 10^{-2}$	18/75 80,24)
ATM Signaling	$4{,}63 \cdot 10^{-2}$	23/61 (0,377)
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	$4{,}65 \cdot 10^{-2}$	22/66 (0,333)

Top Molecules

Molecules up-regulated	Exp. Value
HSPA6	121,917
MT1M	43,556
HSPA1L	23,596
MT1G	20,379
MT1E	18,390
NPPB	17,339
HMOX1	17,191
MT1H	14,152
MT1F	12,368
HSPA1A/HSPA1B	12,305

Molecules down-regulated	Exp. Value
EPB41L3	-9,103
IFIT1	-8,521
ADH4	-8,256
APOC3	-8,149
ORM1	-7,085
ALB	-6,853
KLB	-6,720
GABRB1	-6,335
KNG1	-6,271
AGT	-6,200

Upstream Regulators

Upstream Regulator (Molecule Type)	Fold Change	Predicted Action State (z-score)	p-value of overlap	#Target molecules
IFNL1 (cytokine)	1,175	Inhibited (-4,844)	$4{,}26 \cdot 10^{-8}$	40
Interferon alpha (group)		Inhibited (-4,757)	$1{,}72 \cdot 10^{-1}$	82
HNF1A (Transcription regulator)	-1,170	Inhibited (-4,677	$4{,}08 \cdot 10^{-5}$	145
HNF4A (Transcription regulator)	-2,048	Inhibited (-4,509)	$1{,}55 \cdot 10^{-22}$	707
IRF7 (Transcription regulator)	-1,684	Inhibited (-4,368)	$2{,}98 \cdot 10^{-1}$	34
PPARG (ligand-dependent nuclear receptor)	-1,137	Inhibited (-4,141)	$5{,}06 \cdot 10^{-4}$	117
IFNA2 (cytokine)	1,015	Inhibited (-3,967)	$3{,}16 \cdot 10^{-4}$	78
IFNB1 (cytokine)	-1,013	Inhibited (-3,676)	$1{,}35 \cdot 10^{-4}$	61
IRF1 (Transcription regulator)	1,013	Inhibited (-3,489)	$6{,}35 \cdot 10^{-2}$	44
KLF15 (Transcription regulator)	1,122	Inhibited (-3,381)	$1{,}05 \cdot 10^{-1}$	14
SFTPA1 (transporter)		Inhibited (-3,266)	$5{,}41 \cdot 10^{-2}$	25
IFN Beta (group)		Inhibited (-3,235)	$6{,}08 \cdot 10^{-2}$	31
IFNA13 (cytokine)	-1,103	Inhibited (-3,177)	$2{,}11 \cdot 10^{-2}$	19
SCAP (other)	-1,263	Inhibited (-3,142)	$9{,}46 \cdot 10^{-4}$	24
TGM2 (enzyme)	-1,317	Inhibited (-2,903)	$1{,}83 \cdot 10^{-2}$	71
IFNAR2 (transmembrane receptor)	-1,465	Inhibited (-2,828)	$4{,}39 \cdot 10^{-2}$	8
TFAM (Transcription regulator)	1,732	Inhibited (-2,828)	$8{,}81 \cdot 10^{-2}$	8
IFN type 1 (group)		Inhibited (-2,823)	$1{,}26 \cdot 10^{-1}$	14
SMARCB1 (Transcription regulator)	1,153	Inhibited (-2,819)	$8{,}39 \cdot 10^{-3}$	54
DACH1 (Transcription regulator)	-1,101	Inhibited (-2,789)	$1{,}17 \cdot 10^{-1}$	8
STAT1 (Transcription regulator)	-1,767	Inhibited (-2,776)	$5{,}01 \cdot 10^{-3}$	73
NR3C1 (ligand-dependent nuclear receptor)	-2,157	Inhibited (-2,774)	$3{,}21 \cdot 10^{-6}$	205
SASH1 (other)	-1,249	Inhibited (-2,683)	$2{,}75 \cdot 10^{-1}$	20
Ifn (group)		Inhibited (-2,644)	$4{,}59 \cdot 10^{-3}$	34
Hdac (group)		Inhibited (-2,623)	$2{,}05 \cdot 10^{-2}$	43
LHX1 (Transcription regulator)	1,108	Inhibited (-2,610)	$3{,}02 \cdot 10^{-1}$	20
IRF3 (Transcription regulator)	1,023	Inhibited (-2,577)	$1{,}94 \cdot 10^{-1}$	33
SIRT2 (Transcription regulator)	-1,646	Inhibited (-2,574)	$3{,}81 \cdot 10^{-2}$	7
PARP9 (other)	-1,945	Inhibited (-2,550)	$3{,}29 \cdot 10^{-3}$	10
FOXO3 (Transcription regulator)	-1,382	Inhibited (-2,503)	$4{,}33 \cdot 10^{-4}$	51
Nr1h (group)		Inhibited (-2,472)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	11
SAMSN1 (other)	-1,072	Inhibited (-2,449)	$3{,}27 \cdot 10^{-1}$	24
MITF (Transcription regulator)	-1,287	Inhibited (-2,441)	$7{,}09 \cdot 10^{-2}$	47

Upstream Regulator (Molecule Type)	Fold Change	Predicted Action State (z-score)	p-value of overlap	#Target molecules
PTX3 (other)	-1,030	Inhibited (-2,440)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	6
PPARGC1A (Transcription regulator)	1,129	Inhibited (-2,433)	1,72	48
PRKAA2 (kinase)	1,324	Inhibited (-2,417)	$2{,}46 \cdot 10^{-1}$	10
LPL (enzyme)	1,026	Inhibited (-2,401)	$1{,}30 \cdot 10^{-1}$	13
GRHL2 (Transcription regulator)	1,313	Inhibited (-2,400)	$5{,}08 \cdot 10^{-2}$	6
STAT2 (Transcription regulator)	-1,622	Inhibited (-2,376)	$5{,}68 \cdot 10^{-3}$	14
DOCK8 (other)	-1,412	Inhibited (-2,357)	$3{,}91 \cdot 10^{-1}$	18
PPARGC1B (Transcription regulator)	1,163	Inhibited (-2,354)	$1{,}56 \cdot 10^{-1}$	13
PTPRJ (phosphatase)	-1,519	Inhibited (-2,333)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	10
RXRA (ligand-dependent nuclear receptor)	-2,992	Inhibited (-2,269)	$3{,}93 \cdot 10^{-1}$	61
XBP1 (Transcription regulator)	-1,095	Inhibited (-2,257)	$2{,}00 \cdot 10^{-2}$	61
IFNK (cytokine)	1,094	Inhibited (-2,236)	$5{,}68 \cdot 10^{-1}$	5
TANK (other)	-1,854	Inhibited (-2,236)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	7
PPP3R1 (phosphatase)	1,402	Inhibited (-2,236)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	5
PTPN6 (phosphatase)	-1,400	Inhibited (-2,213)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	5
SREBF1 (Transcription regulator)	1,273	Inhibited (-2,205)	$1{,}66 \cdot 10^{-2}$	55
SREBF2 (Transcription regulator)	-1,295	Inhibited (-2,199)	$8{,}76 \cdot 10^{-4}$	31
IFNA16 (cytokine)	1,100	Inhibited (-2,187)	$3{,}26 \cdot 10^{-1}$	5
NRL (Transcription regulator)	-1,210	Inhibited (-2,183)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	8
TAF4 (Transcription regulator)	-1,069	Inhibited (-2,161)	$1{,}83 \cdot 10^{-3}$	36
EIF2AK2 (kinase)	-1,870	Inhibited (-2,130)	$3{,}08 \cdot 10^{-4}$	34
Estrogen receptor (group)		Inhibited (-2,107)	$9{,}83 \cdot 10^{-5}$	84
WISP2 (growth factor)	1,202	Inhibited (-2,099)	$3{,}92 \cdot 10^{-4}$	19
CFTR (ion channel)	-1,485	Inhibited (-2,070)	$1{,}39 \cdot 10^{-1}$	23
SGK1 (kinase)	1,301	Inhibited (-2,041)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	12
RUNX2 (Transcription regulator)	1,127	Inhibited (-2,034)	$2{,}74 \cdot 10^{-2}$	32
APOE (transporter)	-1,413	Inhibited (-2,032)	$1{,}03 \cdot 10^{-1}$	55
INSR (kinase)	-1,779	Inhibited (-2,028)	$6{,}28 \cdot 10^{-6}$	118
Tcf1/3/4 (group)		Inhibited (-2,000)	$2{,}15 \cdot 10^{-2}$	4
PNPLA8 (enzyme)	-1,076	Inhibited (-2,000)	$5{,}06 \cdot 10^{-2}$	4
SAV1 (other)	-1,130	Inhibited (-2,000)	$9{,}29 \cdot 10^{-2}$	4
NTSE (phosphatase)	-1,269	Inhibited (-2,000)	$1{,}14 \cdot 10^{-1}$	6
KCNIP3 (Transcription regulator)	1,129	Inhibited (-2,000)	$2{,}01 \cdot 10^{-1}$	6
STK3 (kinase)	1,098	Inhibited (-2,000)	$2{,}10 \cdot 10^{-1}$	4
SMAD5 (Transcription regulator)	-2,193	Inhibited (-2,000)	$2{,}52 \cdot 10^{-1}$	6
NDN (other)	1,018	Inhibited (-2,000)	$3{,}49 \cdot 10^{-1}$	4
COBRA1 (other)	-1,079	Inhibited (-2,000)	$4{,}21 \cdot 10^{-1}$	4
IGFBP7 (transporter)	-2,189	Inhibited (-2,000)	$4{,}90 \cdot 10^{-1}$	4
HOXA11 (Transcription regulator)	1,213	Inhibited (-2,000)	$4{,}90 \cdot 10^{-1}$	4
CRTC2 (other)	1,239	Inhibited (-2,000)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	4
AKT3 (kinase)	1,209	Activated (2,000)	$4{,}51 \cdot 10^{-1}$	5
PEX5L (ion channel)	1,118	Activated (2,000)	$4{,}21 \cdot 10^{-1}$	4
TRPC1 (ion channel)	-1,367	Activated (2,000)	$3{,}49 \cdot 10^{-1}$	4
CD53 (other)	-1,151	Activated (2,000)	$2{,}10 \cdot 10^{-1}$	4
WWTR1 (Transcription regulator)	1,540	Activated (2,000)	$2{,}10 \cdot 10^{-1}$	4
CCR9 (G-protein couples receptor)	-1,108	Activated (2,000)	$1{,}47 \cdot 10^{-1}$	4
ADAM21 (peptidase)	-1,098	Activated (2,000)	$9{,}29 \cdot 10^{-2}$	4
MCAM (other)	-1,538	Activated (2,000)	$6{,}93 \cdot 10^{-3}$	5
Actin (group)		Activated (2,000)	$2{,}18 \cdot 10^{-3}$	6
ID1 (Transcription regulator)	1,154	Activated (2,013)	$4{,}51 \cdot 10^{-1}$	10
Cerb (group)		Activated (2,026)	$4{,}96 \cdot 10^{-2}$	63

Upstream Regulator (Molecule Type)	Fold Change	Predicted Action State (z-score)	p-value of overlap	#Target molecules
F2R (G-protein coupled receptor)	-1,578	Activated (2,030)	$8{,}01 \cdot 10^{-2}$	17
EGR1 (Transcription regulator)	6,337	Activated (2,031)	$9{,}50 \cdot 10^{-3}$	49
CDKN1A (kinae)	2,009	Activated (2,031)	$6{,}00 \cdot 10^{-2}$	63
ATM (kinase)	1,635	Activated (2,066)	$5{,}88 \cdot 10^{-3}$	22
AGT (growth factor)	-6,200	Activated (2,078)	$7{,}19 \cdot 10^{-2}$	116
PLAT (peptidase)	1,005	Activated (2,078)	$8{,}98 \cdot 10^{-2}$	9
INSIG1 (other)	1,927	Activated (2,110)	$3{,}58 \cdot 10^{-1}$	29
MYCN (Transcription regulator)	-1,286	Activated (2,124)	$3{,}35 \cdot 10^{-4}$	85
EGFR (kinase)	1,927	Activated (2,126)	$1{,}01 \cdot 10^{-3}$	85
PRKCD (kinase)	-1,319	Activated (2,131)	$1{,}76 \cdot 10^{-1}$	23
ETV5 (Transcription regulator)	4,989	Activated (2,138)	$1{,}22 \cdot 10^{-1}$	15
IL4 (cytokine)	1,167	Activated (2,141)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	163
PRKCE (kinase)	-1,113	Activated (2,154)	$2{,}34 \cdot 10^{-1}$	19
MAP2K7 (kinase)	1,489	Activated (2,156)	$2{,}15 \cdot 10^{-2}$	21
PRKACA (kinase)	-1,641	Activated (2,157)	$5{,}44 \cdot 10^{-1}$	11
SMAD3 (Transcription regulator)	-1,318	Activated (2,159)	$4{,}99 \cdot 10^{-2}$	54
GPI (enzyme)	-1,058	Activated (2,160)	$2{,}17 \cdot 10^{-3}$	8
TAB1 (enzyme)	-1,165	Activated (2,166)	$5{,}29 \cdot 10^{-2}$	11
BRAF (enzyme)	-4,427	Activated (2,169)	$1{,}62 \cdot 10^{-1}$	12
STK11 (kinase)	1,093	Activated (2,173)	$1{,}73 \cdot 10^{-1}$	36
TNFSF13B (cytonine)	-1,099	Activated (2,180)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	8
SPARC (other)	-2,633	Activated (2,184)	$4{,}07 \cdot 10^{-3}$	9
TNFRSF1A (transmembran receptor)	1,185	Activated (2,189)	$4{,}84 \cdot 10^{-1}$	24
SNAI2 (Transcription regulator)	1,033	Activated (2,194)	$1{,}83 \cdot 10^{-1}$	13
Fcor (other)		Activated (2,197)	$6{,}83 \cdot 10^{-2}$	5
RPS6KA5 (kinase)	-1,577	Activated (2,200)	$1{,}14 \cdot 10^{-1}$	6
BTK (kinase)	1,553	Activated (2,200)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	12
MAP3K3 (kinase)	-1,275	Activated (2,201)	$1{,}88 \cdot 10^{-1}$	24
MAP3K1 (kinase)	-1,438	Activated (2,203)	$2{,}64 \cdot 10^{-3}$	24
GATA4 (Transcription regulator)	-1,105	Activated (2,205)	$4{,}75 \cdot 10^{-1}$	23
TGFBR1 (kinase)	-1,263	Activated (2,213)	$1{,}94 \cdot 10^{-1}$	15
SSRP1 (other)	1,223	Activated (2,213)	$5{,}68 \cdot 10^{-3}$	14
PGR (ligand-dependant nuclear receptor)	1,189	Activated (2,215)	$2{,}19 \cdot 10^{-5}$	61
HSD17B4 (enzyme)	-1,310	Activated (2,219)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	5
Angiotensin II receptor (group)		Activated (2,219)	$4{,}51 \cdot 10^{-1}$	5
RASGRF1 (other)	1,134	Activated (2,224)	$6{,}83 \cdot 10^{-2}$	5
HDAC6 (Transcription regulator)	-1,306	Activated (2,226)	$1{,}13 \cdot 10^{-1}$	11
NTRK1 (kinase)	1,047	Activated (2,236)	$2{,}89 \cdot 10^{-1}$	7
Jnk (group)		Activated (2,247)	$4{,}52 \cdot 10^{-1}$	40
POMC (other)	1,003	Activated (2,262)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	17
TWIST2 (Transcription regulator)	-1,026	Activated (2,267)	$6{,}69 \cdot 10^{-2}$	9
SMAD2 (Transcription regulator)	-1,260	Activated (2,268)	$4{,}61 \cdot 10^{-1}$	16
PTGS2 (enzyme)	-1,483	Activated (2,275)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	31
ITGB1 (transmembran receptor)	1,213	Activated (2,297)	$2{,}49 \cdot 10^{-1}$	20
BMP6 (growth factor)	-1,141	Activated (2,307)	$8{,}78 \cdot 10^{-3}$	33
TGFB1 (growth factor)	1,591	Activated (2,308)	$5{,}17 \cdot 10^{-7}$	472
POU5F1 (Transcription regulator)	1,100	Activated (2,309)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	17
IRGM (oteher)	1,027	Activated (2,324)	$4{,}31 \cdot 10^{-2}$	15
MAP2K4 (kinase)	1,238	Activated (2,330)	$1{,}69 \cdot 10^{-2}$	21
MKL2 (Transcription regulator)	-2,362	Activated (2,333)	$4{,}10 \cdot 10^{-1}$	22
MMP9 (peptidase)	1,083	Activated (2,339)	$1{,}61 \cdot 10^{-1}$	16

Upstream Regulator (Molecule Type)	Fold Change	Predicted Action State (z-score)	p-value of overlap	#Target molecules
HMGA1Δ (other)	1,418	Activated (2,347)	$1{,}22 \cdot 10^{-1}$	15
TBX5 (Transcription regulator)	-1,179	Activated (2,358)	$2{,}57 \cdot 10^{-1}$	12
EDN3 (other)	1,215	Activated (2,359)	$3{,}31 \cdot 10^{-2}$	9
HGF (growth factor)	-1,152	Activated (2,373)	$4{,}21 \cdot 10^{-11}$	187
TLR9 (transmembran receptor)	-1,067	Activated (2,376)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	24
Ras (group)		Activated (2,388)	$4{,}61 \cdot 10^{-4}$	42
TAZ (enzyme)	-1,301	Activated (2,390)	$8{,}50 \cdot 10^{-3}$	25
CAMK4 (kinase)	1,058	Activated (2,391)	$3{,}01 \cdot 10^{-1}$	9
BDNF (growth factor)	3,081	Activated (2,406)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	46
IGF1 (growth factor)	-1,122	Activated (2,428)	$1{,}49 \cdot 10^{-1}$	93
SMERCE1 (Transcription regulator)	-1,406	Activated (2,433)	$8{,}81 \cdot 10^{-2}$	8
MAPK3 (kinase)	-1,155	Activated (2,441)	$5{,}12 \cdot 10^{-2}$	20
RLIM (enzyme)	1,533	Activated (2,449)	$5{,}90 \cdot 10^{-3}$	7
MAP2K1 (kinase)	1,168	Activated (2,484)	$2{,}95 \cdot 10^{-2}$	49
TGFB3 (growth factor)	-1,302	Activated (2,505)	$3{,}24 \cdot 10^{-5}$	39
CCL5 (cytokine)	-1,089	Activated (2,519)	$1{,}51 \cdot 10^{-1}$	21
Il3 (cytokine)		Activated (2,529)	$2{,}00 \cdot 10^{-1}$	20
NFKB2 (Transcription regulator)	1,142	Activated (2,548)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	9
NGF (growth factor)	-1,048	Activated (2,553)	$4{,}30 \cdot 10^{-2}$	52
NAMPT (cytokine)	1,528	Activated (2,555)	$3{,}39 \cdot 10^{-1}$	7
Raf (group)		Activated (2,563)	$3{,}65 \cdot 10^{-2}$	10
CXCR4 (G-protein coupled receptor)	2,758	Activated (2,568)	$3{,}33 \cdot 10^{-2}$	15
NKX2-3 (Transcription regulator)	-1,228	Activated (2,571)	$3{,}26 \cdot 10^{-1}$	58
IL1RN (cytokine)	1,221	Activated (2,580)	$4{,}52 \cdot 10^{-3}$	41
TGFA (growth factor)	1,187	Activated (2,585)	$1{,}36 \cdot 10^{-2}$	29
CCND1 (other)	1,858	Activated (2,610)	$1{,}07 \cdot 10^{-5}$	89
CHRM1 (G-protein coupled receptor)	1,075	Activated (2,613)	$1{,}24 \cdot 10^{-2}$	7
TCF (group)		Activated (2,613)	$1{,}93 \cdot 10^{-2}$	32
PTK2 (kinase)	-2,153	Activated (2,613)	$3{,}42 \cdot 10^{-2}$	18
P38 MAPK (group)		Activated (2,619)	$2{,}54 \cdot 10^{-1}$	74
DNMT3B (enzyme)	1,184	Activated (2,621)	$8{,}90 \cdot 10^{-2}$	24
HSF2 (Transcription regulator)	-1,225	Activated (2,621)	$5{,}10 \cdot 10^{-2}$	10
TNFSF12 (cytokine)	-1,017	Activated (2,627)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	11
FLI1 (Transcription regulator)	-1,108	Activated (2,636)	$1{,}14 \cdot 10^{-1}$	17
MSTN (growth factor)	1,051	Activated (2,644)	$1{,}10 \cdot 10^{-1}$	12
VEGFA (growth factor)	-1,459	Activated (2,646)	$1{,}50 \cdot 10^{-2}$	70
Akt (group)		Activated (2,670)	$2{,}30 \cdot 10^{-1}$	53
CREM (Transcription regulator)	1,937	Activated (2,674)	$4{,}87 \cdot 10^{-2}$	45
IL1B (cytokine)	-1,177	Activated (2,735)	$2{,}20 \cdot 10^{-2}$	205
PLAU (peptidase)	1,102	Activated (2,760)	$3{,}89 \cdot 10^{-1}$	9
HOXA5 (Transcription regulator)	-1,214	Activated (2,772)	$4{,}81 \cdot 10^{-2}$	9
Rock (group)		Activated (2,813)	$1{,}35 \cdot 10^{-2}$	15
REL (Transcription regulator)	-1,346	Activated (2,826)	$1{,}00 \cdot 10^{0}$	27
SATB1 (Transcription regulator)	1,199	Activated (2,840)	$1{,}22 \cdot 10^{-3}$	41
Mapk (group)		Activated (2,858)	$3{,}72 \cdot 10^{-3}$	37
Nfat (family) (group)		Activated (2,927)	$3{,}02 \cdot 10^{-1}$	24
NRG1 (growth factor)	2,054	Activated (2,942)	$4{,}37 \cdot 10^{-4}$	65
RAF1 (kinase)	1,610	Activated (2,953)	$1{,}25 \cdot 10^{-4}$	78
ERK1/2 (group)		Activated (3,000)	$5{,}73 \cdot 10^{-2}$	67
TRIM24 (Transcription regulator)	-1,366	Activated (3,002)	$1{,}07 \cdot 10^{-2}$	33
Pkc(s) (group)		Activated (3,061)	$1{,}37 \cdot 10^{-2}$	52

Upstream Regulator (Molecule Type)	Fold Change	Predicted Action State (z-score)	p-value of overlap	#Target molecules
MKL1 (Transcription regulator)	1,348	Activated (3,088)	$1{,}14 \cdot 10^{-1}$	31
F7 (peptidase)	-2,356	Activated (3,230)	$2{,}00 \cdot 10^{-1}$	11
RET (kinase)	1,158	Activated (3,254)	$4{,}61 \cdot 10^{-4}$	42
INHBA (growth factor)	1,398	Activated (3,390)	$1{,}88 \cdot 10^{-1}$	47
CERB1 (Transcription regulator)	-1,970	Activated (3,400)	$7{,}43 \cdot 10^{-2}$	72
IL2 (cytokine)	-1,134	Activated (3,464)	$1{,}40 \cdot 10^{-3}$	142
MAP2K1/2 (group)		Activated (3,492)	$2{,}11 \cdot 10^{-2}$	19
SRF (Transcription regulator)	1,508	Activated (3,667)	$1{,}88 \cdot 10^{-3}$	98
NFE2L2 (Transcription regulator)	1,412	Activated (3,692)	$3{,}29 \cdot 10^{-4}$	118
ERK (group)		Activated (3,740)	$7{,}19 \cdot 10^{-4}$	70
TREM1 (transmembrane receptor)	1,076	Activated (3,779)	$2{,}78 \cdot 10^{-3}$	68
Mek (group)		Activated (3,812)	$2{,}82 \cdot 10^{-6}$	56
KRAS (enzyme)	-1,356	Activated (3,922)	$5{,}89 \cdot 10^{-7}$	111
EGF (growth factor)	1,041	Activated (4,030)	$4{,}29 \cdot 10^{-5}$	143
EDN1 (cytokine)	2,107	Activated (4,325)	$7{,}96 \cdot 10^{-4}$	62
MYC (Transcription regulator)	1,248	Activated (4,337)	$8{,}3 \cdot 10^{-11}$	273
FGF2 (groth factor)	-1,127	Activated (4,605)	$4{,}94 \cdot 10^{-3}$	98
MAPK1 (kinase)	1,160	Activated (4,847)	$1{,}34 \cdot 10^{-9}$	129
F2 (peptidase)	-1,355	Activated (4,989)	$6{,}13 \cdot 10^{-4}$	87

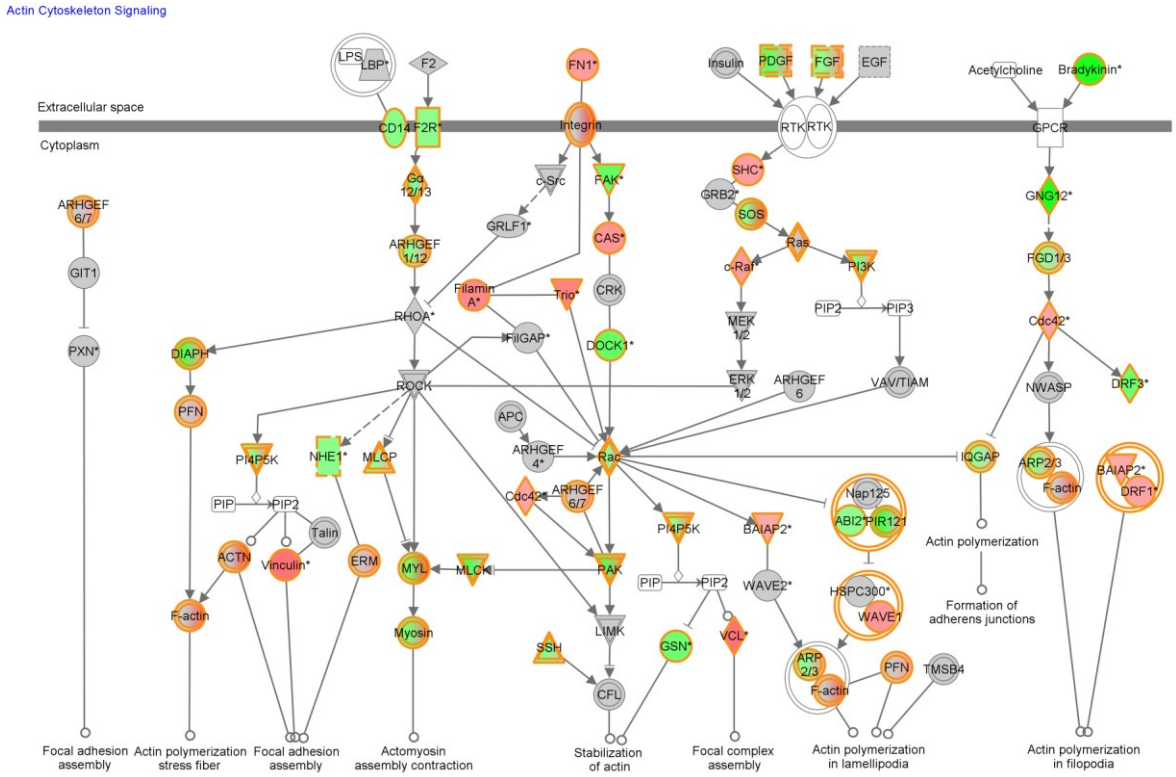

Abbildung A4: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Actin Cytoskeleton Siganaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

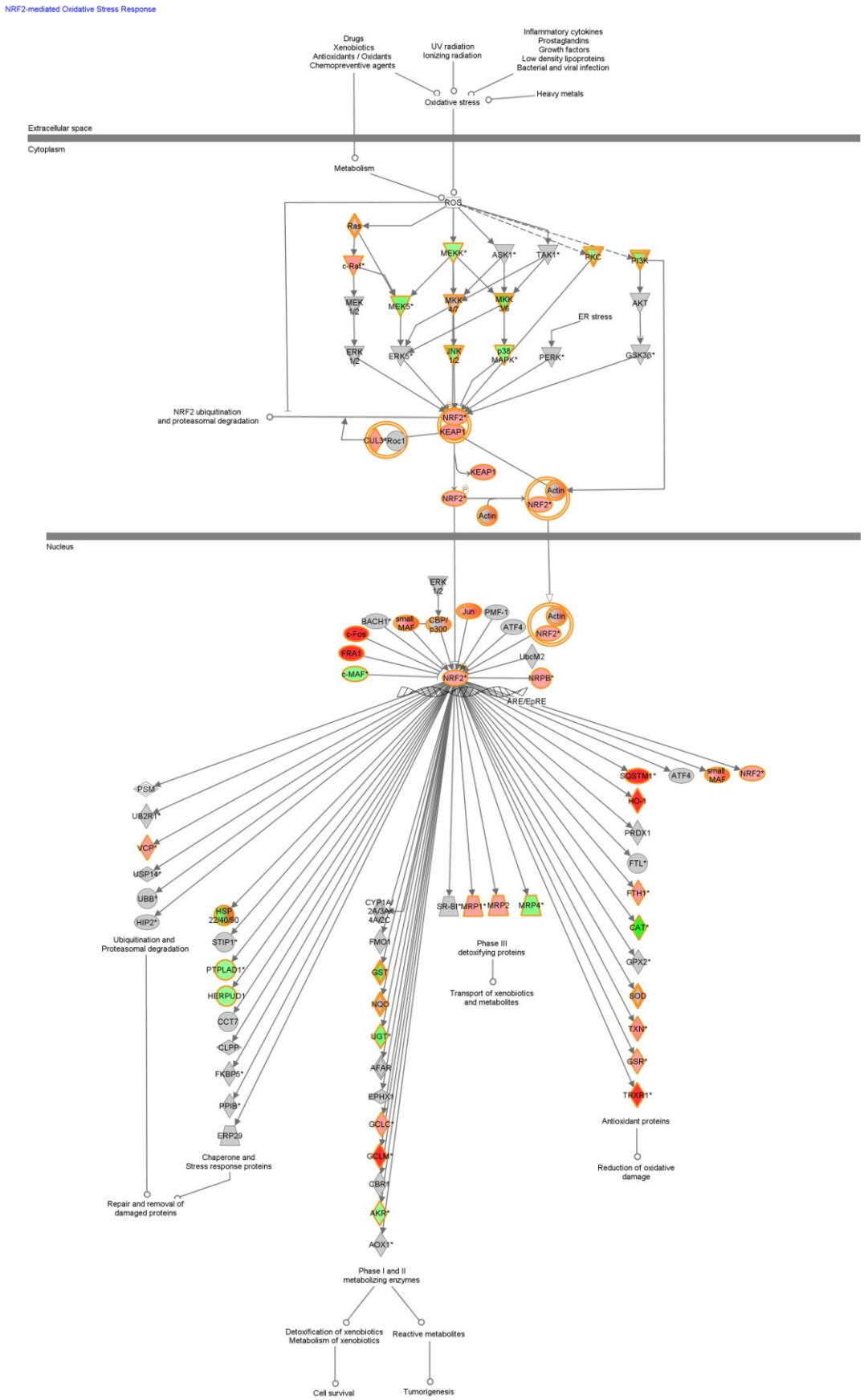

Abbildung A5: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway)* "*NRF2-mediated Oxidative Stress Response*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

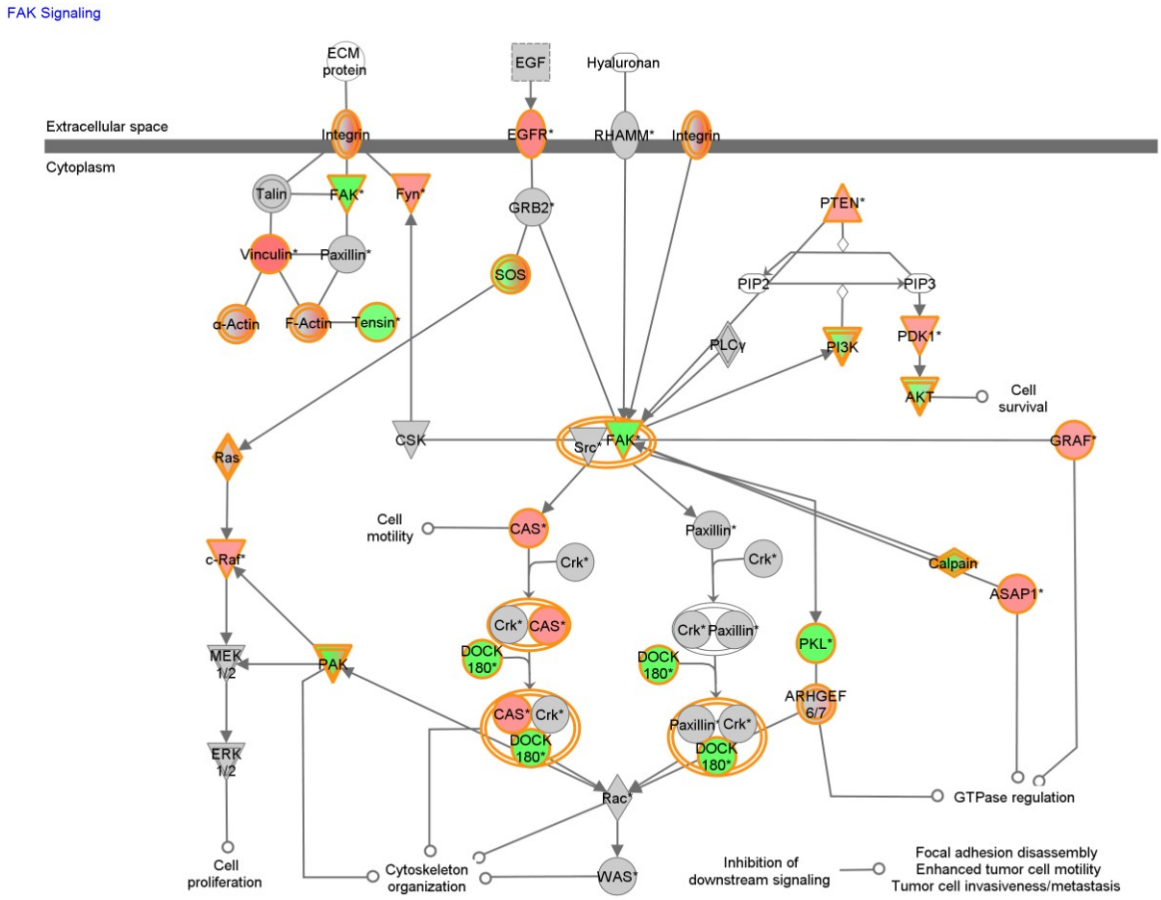

Abbildung A6: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway)* "*FAK Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

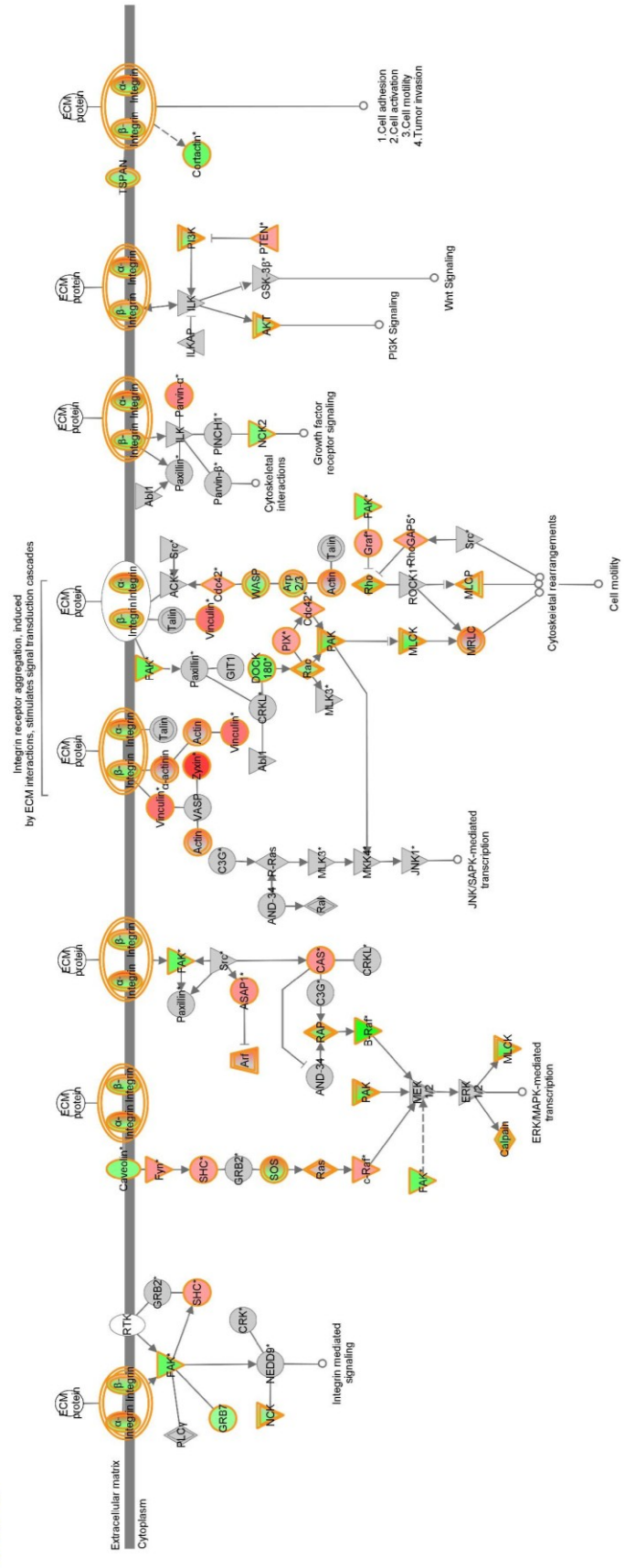

Abbildung A7: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Integrin Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

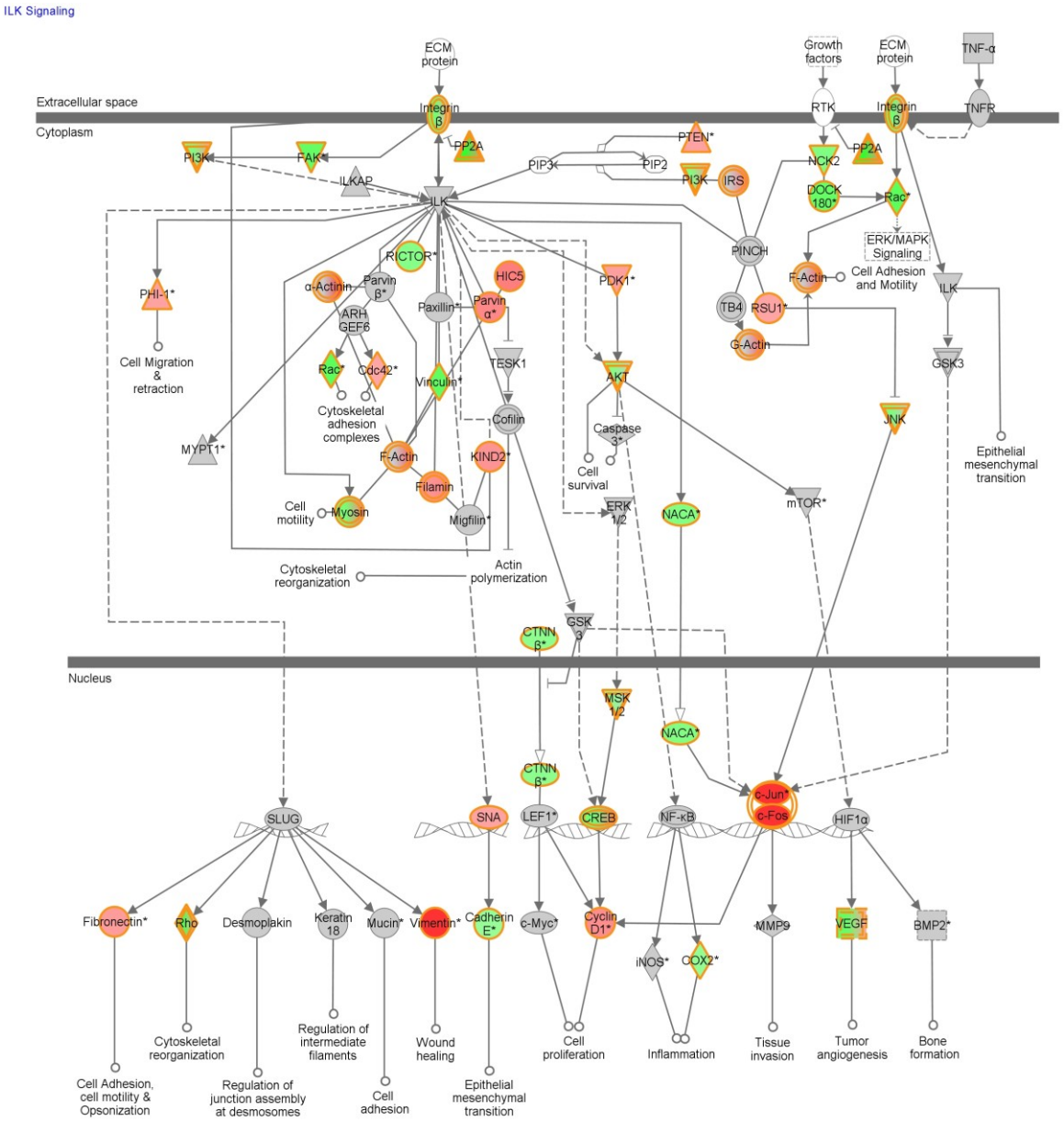

Abbildung A8: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*ILK Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

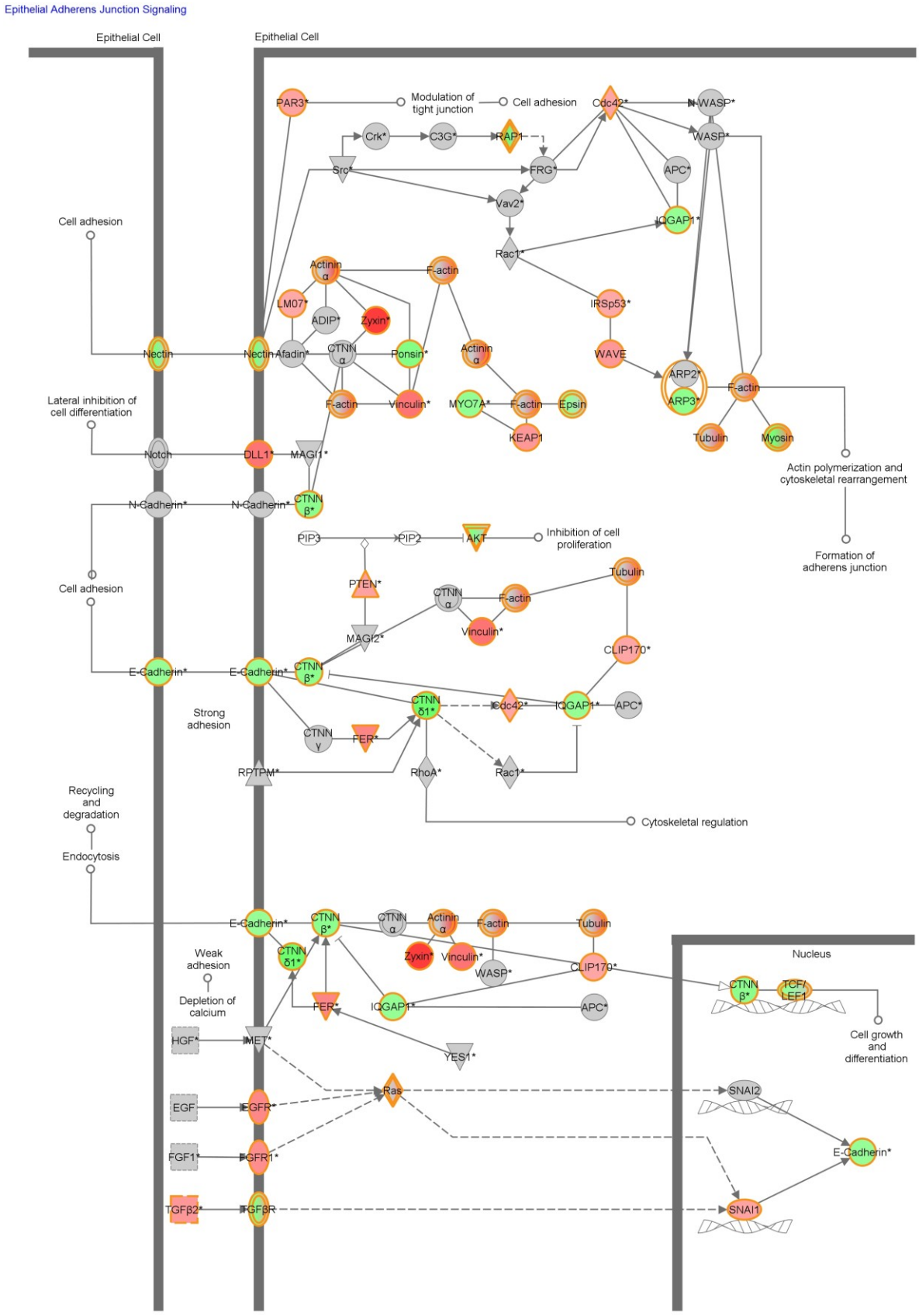

Abbildung A9: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Epithelial Adherens Junction Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

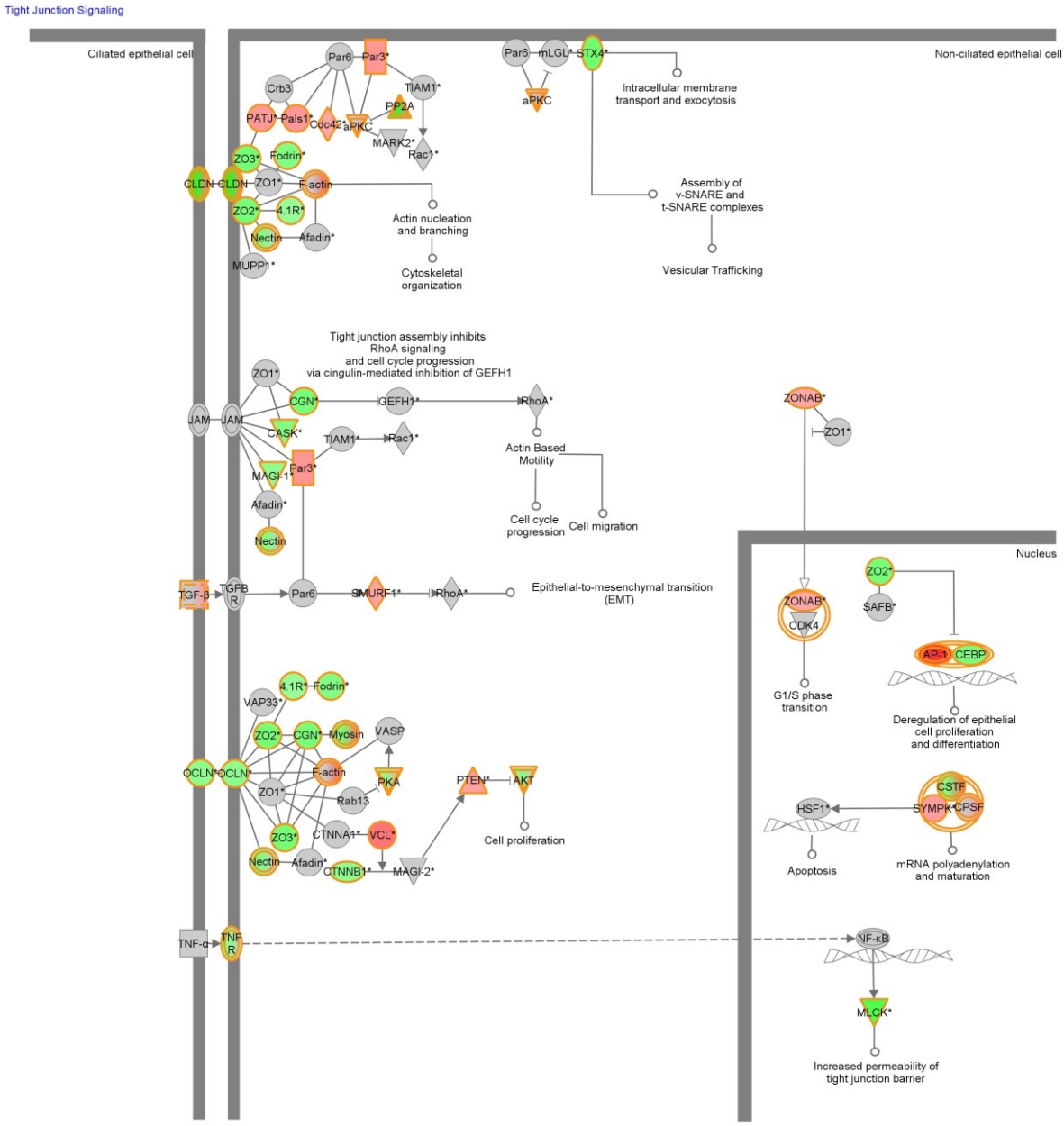

Abbildung A10: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway*) "*Tight Junction Signaling*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 25 µg/mL Tensid-beschichteten Silbernanopartikeln inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

0,5 µg/mL Silbernitrat

Networks

Associated Network Function	Score
Hereditary Disorder, Ophthalmic Disorder, Renal and Urological Disease	99
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Development	72

Bio Function – Molecular and Cellular Functions

Category	Function Annotation	p-value	Predicted Activation (z-score)	#Molecules
Gene Expression	Transcription	$4{,}36 \cdot 10^{-2}$	Decreased (-2,872)	22
Cellular Movement	Migration of cervical cancer cell lines	$6{,}81 \cdot 10^{-4}$	Decreased (-2,000)	4

Canonical Pathways

Name	p-value	Ratio
fMLP Signaling in Neutrophils	$6{,}20 \cdot 10^{-3}$	4/129 (0,031)
Cardiac β-adrenergic Signaling	$1{,}28 \cdot 10^{-2}$	4/154 (0,026)
Glycerol-3-phosphate Shuttle	$1{,}38 \cdot 10^{-2}$	1/9 (0,111)
G Protein Signaling Mediated by Tubby	$1{,}93 \cdot 10^{-2}$	2/42 (0,048)
PPARα/RXRα Activation	$2{,}69 \cdot 10^{-2}$	4/191 (0,021)
Protein Ubiquitination Pathway	$2{,}95 \cdot 10^{-2}$	5/268 (0,019)
RAR Activation	$2{,}96 \cdot 10^{-2}$	4/189 (0,021)
Glycerol Degradation I	$3{,}41 \cdot 10^{-2}$	1/12 (0,083)
Systemic Lupus Erthematosus Signaling	$3{,}42 \cdot 10^{-2}$	4/247 (0,016)
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	$3{,}55 \cdot 10^{-2}$	2/48 (0,042)
Androgen Signaling	$4{,}06 \cdot 10^{-2}$	3/144 (0,021)

Top Molecules

Molecules up-regulated	Exp. Value
EPB41L2	1,495
MAGEB4	1,466
METAP1D	1,463
FAM120C	1,435
TMEM45A	1,428
HIST1H2AG	1,423
FCHSD1	1,421
C2orf51	1,410
USP51	1,408
CHN1	1,406

Molecules down-regulated	Exp. Value
MYO10	-1,983
MYO6	-1,838
SEPW1	-1,811
MT1X	-1,794
CEP290	-1,780
TFRC	-1,744
MLLT10	-1,718
FAM170B	-1,702
MYH10	-1,689
NRTN	-1,688

Upstream Regulators

Upstream Regulator (Molecule Type)	Fold Change	Predicted Action State (z-score)	p-value of overlap	#Target molecules
SYVN1 (transporter)	1,132	Inhibited (-2,000)	$1{,}02 \cdot 10^{-2}$	4

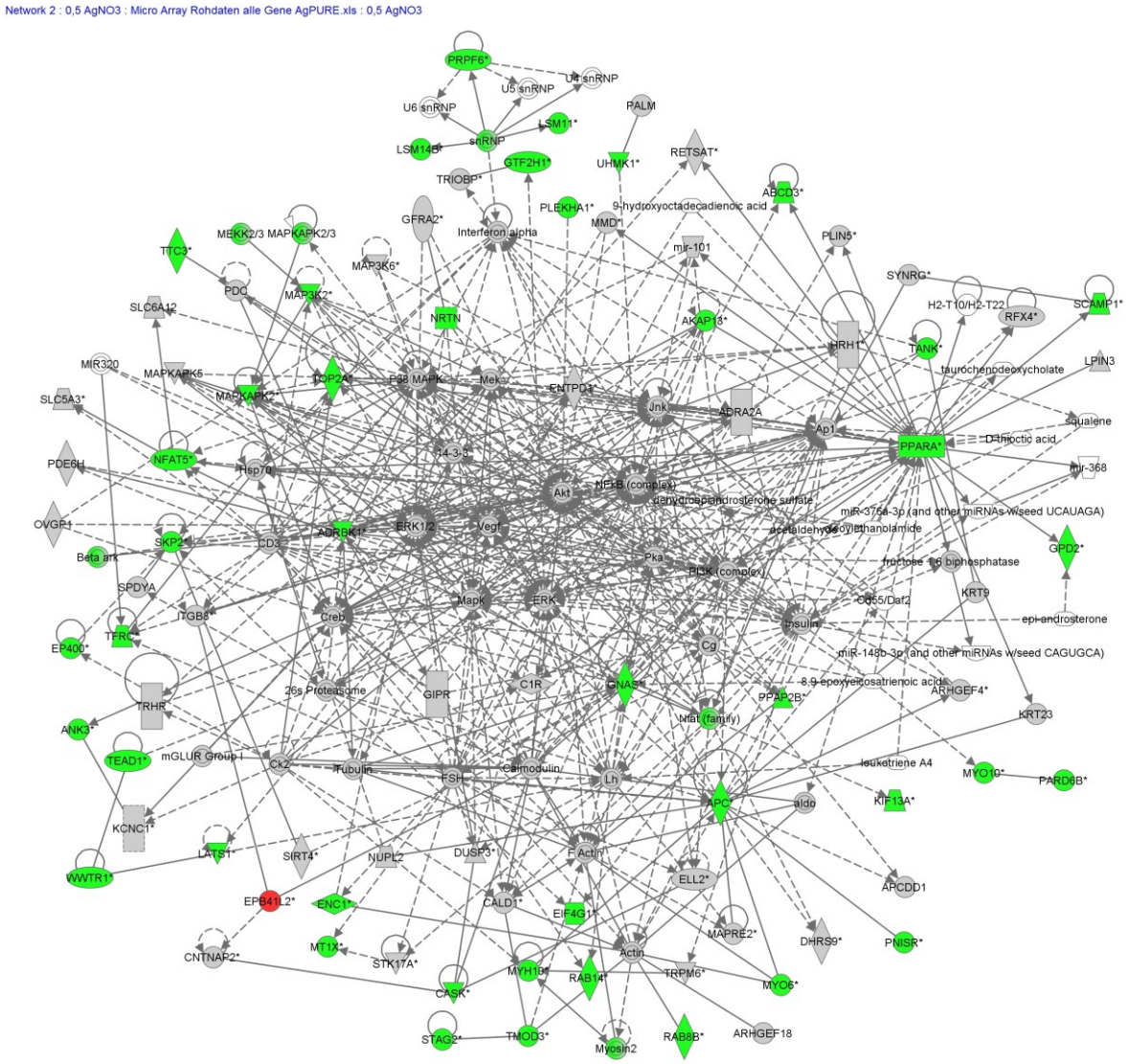

Abbildung A11: Netzwerk (*Top Network*) "*Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Development*" (*Score* 72) der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 0,5 µg/mL Silberionen inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.

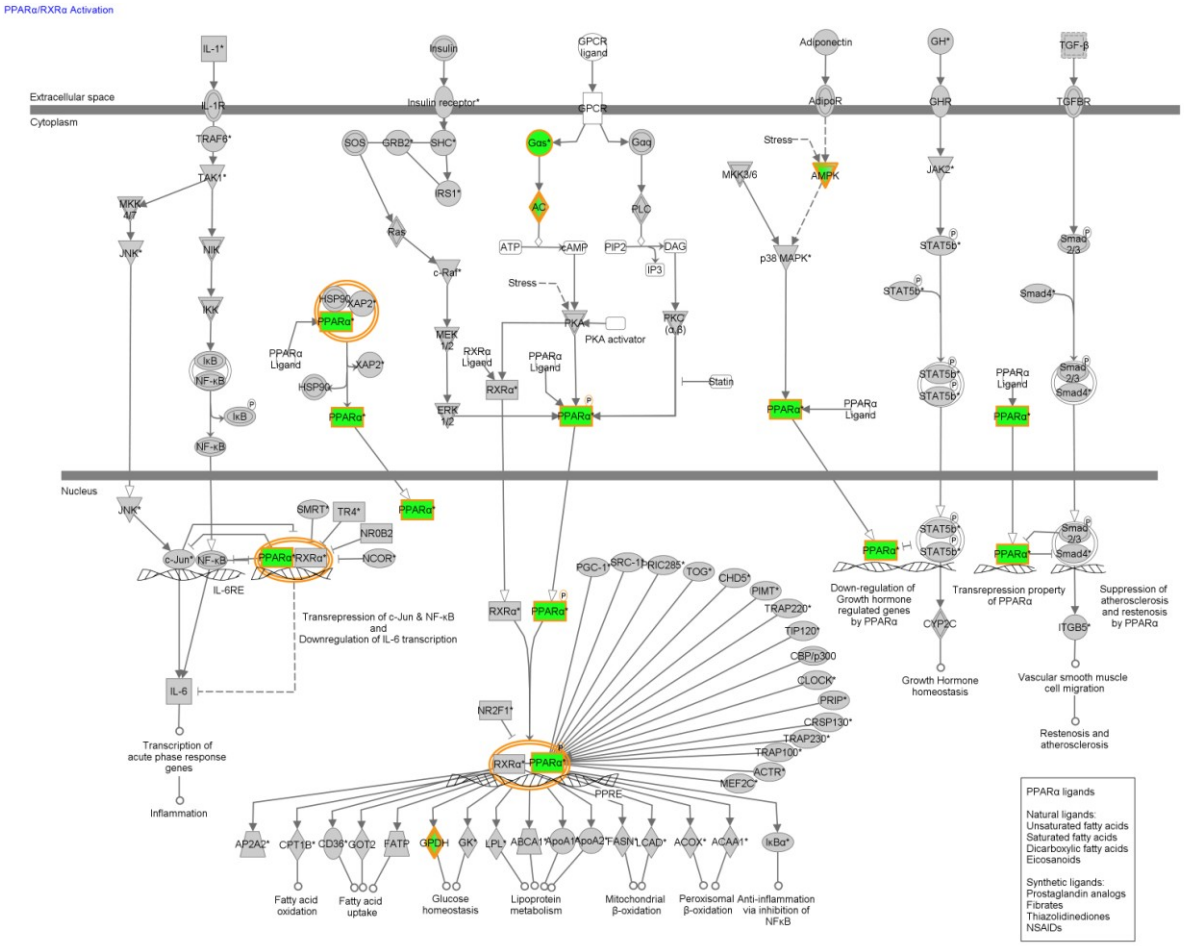

Abbildung A12: Stoffwechselweg (*Canonical Pathway)* "*PPARα/RXRα Activation*" der *Ingenuity Pathway Analysis* der Micro-Array Daten für differenzierte Caco-2 Zellen, die 24 h mit 0,5 µg/mL Silberionen inkubiert wurden. Rot zeigt eine Hochregulation und grün eine Runterregulation im Vergleich zur Mediumkontrolle an.