

**Silbernanopartikel und Silberionen:
Physikalisch-chemische Charakterisierung und
molekulare proteomische Effekte auf humane Enterozyten**

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

Ulf Hansen

aus Niebüll



eingereicht an der Fakultät III – Prozesswissenschaften –
im Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie
der TU Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss

Vorsitzender: Prof. Dr. Jens Kurreck

1. Gutachter: Prof. Dr. Lothar W. Kroh

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen

3. Gutachter: Prof. Dr. Andreas F. Thünemann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24.04.2014

Berlin 2014

D 83



BAM



BfR



Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.

(Arno Penzias (*1933), amerikanischer Physiker, 1978 Nobelpreisträger)

Man kann eine Doktorarbeit zwar allein schreiben, aber es bedarf doch einer wesentlich größeren Zahl an Menschen, die an der Entstehung der ihr zugrunde liegenden Daten und Ideen beteiligt waren. Diesen Menschen möchte ich auf diesem Wege meinen Dank aussprechen, denn mit ihrer Geduld mir und meinen Fragen gegenüber waren sie für mich immer wieder ein wichtiger Bezugspunkt meiner praktischen und theoretischen Arbeiten.

Ich danke Professor Dr. Dr. Alfonso Lampen und Professor Dr. Andreas F. Thünemann für die Möglichkeit, in einer Kooperation zweier Bundesanstalten mitzuwirken, die eine exzellente Forschungsumgebung bereithielt. Zudem danke ich ihnen für die Möglichkeit, ein interdisziplinäres Thema zu bearbeiten, was mir ein besonderes Anliegen war, und nicht zuletzt danke ich ihnen auch für die hervorragende Betreuung während meiner Arbeitszeit und darüber hinaus. Selbst an Wochenenden wurden Fragen per Mail beantwortet, was sicher nicht jedem Studenten vergönnt ist. Professor Dr. Kroh von der TU Berlin danke ich dafür, dass er sich sofort bereit erklärte, meine Arbeit als Doktorvater zu betreuen.

Dr. Axel Oberemm, Dr. Patrick Knappe, Dr. Thorsten Buhrke, Dr. Steffen Weidner und Dr. Birgit Niemann gilt mein Dank, da sie immer ein offenes Ohr für meine Ideen hatten und diese durch ihr Wissen bereicherten oder mich bei möglichem Übereifer bremsen.

Als Chemiker waren mir anfangs die Abläufe in einem Zellbiologielabor wenig geläufig und daher möchte ich Christine Meckert und Anja Köllner danken, dass sie mich mit Geduld und guter Anleitung in dieses Themenfeld einarbeiteten und auch danach noch immer mit Rat und Tat zur Stelle waren. Auch wenn man von der Uni viel theoretisches Rüstzeug mitgeliefert bekommt, so muss man sich an neuen Laborgeräten immer wieder einarbeiten, und dabei wurde ich umfassend und kompetent von Karin Böttcher, Christel Rozycki und Franziska Rudolph unterstützt. Dafür und für alle anderen Hilfen im Laboralltag danke ich ihnen sehr.

Da man seine Doktorarbeit nicht ständig im Labor verbringen möchte, war es vor allem meinen Bürokollegen an BAM und BfR verdankt, dass an langen Arbeitstagen für gute Laune gesorgt war und auch die ein oder andere neue Idee zusammen eronnen wurde. Danke dafür an Dr. Ralph Bienert, Matthias Girod, Dr. Patrick Knappe und Dr. Linda Böhmert. Zudem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe um Dr. Steffen Weidner für die herzliche Atmosphäre gerade in für mich schwereren Zeiten. Auch der sportliche Aspekt kam bei meinen Kollegen nicht zu kurz, und daher grüße ich hier auch die BfR Teamstaffel, mit der

ich dreimal erfolgreich am Teamstaffelwettbewerb in Berlin teilnahm und kann nur für die Zukunft sagen: Ihr packt auch eine Stunde und 50 Minuten!

In meiner Kooperation hatte ich das Glück mit vielen verschiedenen Arbeitsgruppen zusammenzuarbeiten und so Einblicke in neue Arbeitsfelder zu erlangen. In diesem Zusammenhang danke ich Dr. Ronald Maul für die Unterstützung bei der Durchführung eines *in-vitro* Verdaus, Dr. Ilona Dörfel für die schönen TEM Aufnahmen und Shireen Weise für ihre Hilfe bei den UV-Vis Messungen.

Nicht zuletzt möchte ich den „guten Geistern“, den Sekretärinnen, der Abteilungen beider Institute für ihre Unterstützung ganz herzlich danken. Ohne Frau Tietz, Frau Swoboda, Frau Grande und Frau Rozycki wäre so mancher Brief nicht rechtzeitig angekommen, sicher einige Formulare falsch ausgefüllt worden und das ein oder andere Paper nicht auffindbar gewesen.

Damit diese Arbeit sich auch für nicht Eingeweihte vernünftig lesen lässt, haben mehrere Korrektoren, Dr. Julia Grandke, Dr. Patrick Knappe, Jörg Villmow, Ulla Hansen und Christian Weiss, so manchen Nerv opfern müssen, aber umso mehr sei ihnen für diese Hilfe gedankt!

Meiner Freundin Julia gebührt mein ganz spezieller Dank: sie ertrug meine Launen, wenn es im Labor oder beim Schreiben nicht rund lief und konnte in diesen Phasen immer neuen Mut und Zuversicht spenden. Sie beruhigte mich, wenn der Respekt vor der anstehenden Prüfung zu groß wurde, sie nahm mir andere Arbeiten ab, damit ich mich auf das Schreiben konzentrieren konnte; kurz gesagt, war sie immer für mich da, wenn ich sie brauchte, Danke!

Zuletzt möchte ich diese Arbeit auch noch meinen Eltern widmen, die mir diesen Lebensweg überhaupt ermöglichten, aber leider nicht mehr an ihm teilhaben konnten. In meinen Gedanken waren sie immer anwesend.

Zusammenfassung

Silbernanopartikel (Ag-NP) können, bedingt durch ihre wachsende Anwendung im Lebensmittelbereich, vermehrt oral aufgenommen und über den Intestinaltrakt resorbiert werden. Die Diversität der physikalisch-chemischen Eigenschaften, der in toxikologischen Studien eingesetzten Nanopartikel (NP), macht eine allgemein gültige Aussage zu ihren physiologischen Wirkungen nicht trivial. Auch die Ursachen ihrer zytotoxischen Eigenschaften werden weiterhin kontrovers diskutiert.

Basierend auf diesen Fragestellungen, wird in dieser Arbeit die physikalisch-chemische Charakterisierung von toxikologisch relevanten Partikeleigenschaften vorgestellt, welche das Zellkulturmedium (ZKM) als chemische Umgebung der NP berücksichtigt. Durch *in-vitro* Experimente mit dem humanen Modell des Intestinaltraktes (Caco-2 Zellen) wurden anschließend die relevanten molekularen Effekte des charakterisierten Ag-NP Referenzmaterials hinsichtlich partikulärer, ionischer oder synergistischer Wirkung untersucht.

Mittels einer Kombination aus Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F) sowie dynamischer Licht- und Röntgenkleinwinkelstreuung konnte eine Zunahme des hydrodynamischen Radius der Partikel im ZKM beobachtet werden. Dieser ließ sich durch nachfolgende energiedispersive Röntgenfluoreszenz Spektroskopie und zweidimensionale Gelelektrophorese mit der Bildung einer Proteinkorona beschreiben, die hauptsächlich aus bovinem Serumalbumin bestand. Die Trennung von ungebundenen Proteinen und Partikeln mit Korona wurde sowohl mittels A4F als auch Zentrifugation durchgeführt, wobei sich die A4F als die sensitivere Methode herausstellte.

Die 24-stündige Exposition der Caco-2 Darmzellen mit jeweils zwei nicht zytotoxischen Konzentrationen des Ag-NP-Referenzmaterials sowie Silberionen aus Silbernitrat (SN) zeigte einen signifikanten Unterschied der Anzahl deregulierter Proteine zwischen partikulärer und ionischer Behandlungsgruppe. Die NP führten im Gegensatz zu den Ionen zu einer vermehrten Herunterregulation der Proteine. Die Auswertung der Proteinderegulationen deutete auf eine Inhibierung pro-inflammatorischer Proteine wie Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B-Cells (NF κ B) durch die NP Behandlungsgruppe hin. SN führte zu einer aktivierten inflammatorischen Antwort. Im Gegensatz zu den SN Behandlungsgruppen zeigten die NP eine vorhergesagte Inhibierung des Nrf2-Signalweges, der oxidativen Stress induziert. Beide NP-Konzentrationen führten in den Zellen zu einer Suppression tumorassoziierter Proteine wie z.B. ADP-sugar Pyrophosphatase (NUDT5). Die Konzentration tumorassoziierter Proteine nach Inkubation mit SN blieb entweder unverändert oder stieg leicht an.

Die Interaktion von Ag-NP mit Caco-2 Zellen führte zur Bildung einer NP-Proteinkorona und damit veränderten Partikeleigenschaften wie dem Partikelradius, die bei der Beurteilung ihrer Toxizität einbezogen werden müssen. Die NP induzierten weder signifikant Entzündungen noch oxidativen Stress, und im Gegensatz zu SN führten sie zu einer Suppression tumorsassoziierter Proteine. Insgesamt bewirkten Ag-NP und Silberionen in den Zellen deutliche Unterschiede der proteomischen Antwort der Caco-2 Zellen. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass die Toxizität von Silber in Form von NP und Salz unabhängig voneinander betrachtet werden muss.

Abstract

The oral uptake of silver nanoparticles (Ag-NP) and their resorption in the intestine has increased due to their widespread application in the food sector. The diverse physico-chemical properties of nanoparticles (NP) in toxicological studies make a common prediction of their physiological impact impossible. Additionally, the cause of the cytotoxicity of the NPs is discussed controversially.

Based on these questions one aim of this work is to establish a physico-chemical characterization of relevant NP properties regarding the special chemical environment in cell culture medium (CCM). Cell culture experiments with human Caco-2 cells as a model for the intestine were conducted to determine whether the origin of the NP-toxicity was based on the ion release, the particles or a combination of both.

An increase of the hydrodynamic particle-radius after exposure to CCM was observed using a combination of asymmetrical flow field-flow fractionation (A4F), dynamic light scattering and small angle X-ray scattering. Energy dispersive X-ray spectroscopy and two-dimensional gel electrophoresis confirmed this observation and revealed a protein corona mainly consisting of serum albumin. The separation of unbound proteins from particles with a corona was conducted with A4F as well as centrifugation resulting in less false-positive protein findings for A4F.

A 24 h exposure of Caco-2 cells with two non-cytotoxic concentrations of Ag-NPs and Ag ions from silver nitrate (SN) each revealed a significant difference in protein regulation for each treatment. Ag-NPs showed prevalence for down regulated proteins compared to the ionic treatment. The analysis of the deregulation patterns revealed the inhibition of pro-inflammatory proteins like Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B-Cells (NF κ B) for both NP treatments. However, both SN treatments induced inflammatory responses and led to the activation of cytokines like TNF- α in the cells. In contrast to the SN treated cells, an inhibition of the Nrf2 pathway was detected for the NP treated cells, which indicated reduced oxidative stress. Proteins associated with cancerous cells, e.g ADP-sugar Pyrophosphatase (NUDT5), were significantly suppressed due to NP treatment, while SN treatment resulted in a slight increase of those proteins.

Exposure of Caco-2 cells to Ag-NPs and SN caused the formation of a protein corona and thereby altered particle properties which have to be considered in the assessment of their toxicity. Neither did NP significantly induce inflammation nor oxidative stress, while SN induced both. Additionally, NP-treatment led to a decrease of tumor-associated proteins.

Summing up, Ag-NPs and SN caused very different proteomic answers and different toxicodynamics in the intestinal cell model making a differentiated toxicological evaluation necessary.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Entstehung des Begriffes <i>Nanopartikel</i>	1
1.2	Besondere physikalische Eigenschaften von Nanopartikeln.....	1
1.3	Natürliche und anthropogene Erzeugung von Nanopartikeln	2
1.4	Klassifikation der Nanopartikel	4
1.5	Einsatzgebiete und potentielle Risiken von Silber Nanopartikeln	5
2	Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
3	Theorie	10
3.1	Feldflussfraktionierung	10
3.1.1	Asymmetrischer Fluss Feldflussfraktionierung (A4F).....	11
3.2	Streuexperimente	17
3.2.1	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS).....	17
3.2.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	23
3.3	Massenspektrometrische Untersuchungen	28
3.3.1	MALDI-MS-MS.....	29
3.4	Zellkultur	36
4	Material und Methoden.....	38
4.1	Wasser.....	38
4.2	Nanopartikel und Silbernitrat	38
4.3	Asymmetrischer Fluss Feld-Flussfraktionierung Experimente	38
4.4	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential	39
4.5	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	40
4.6	Dialyse	40
4.7	Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie	41
4.8	Zentrifugation.....	41
4.9	Transmissionselektronenmikroskopie-Bilder	41
4.10	Zellkultur, Proteinextraktion und Expositionsversuche.....	42
4.11	1-dimensionale Gelelektrophorese.....	42
4.12	2-dimensionale Gelelektrophorese.....	43
4.13	Proteinidentifikation mittels MALDI-MS-MS	44
4.14	Proteomik.....	45

5	Resultate und Diskussion.....	47
5.1	Analytik	47
5.1.1	UV-Vis.....	49
5.1.2	Asymmetrischer Fluss Feld-Flussfraktionierung	51
5.1.3	Dynamische Lichtstreuung	55
5.1.4	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	59
5.1.5	Transmissionselektronenmikroskopie	66
5.1.6	Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie und Dialyse	70
5.1.7	Ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese sowie MALDI-MS-MS.....	74
5.1.8	Vergleich der Koronae nach Asymmetrischer Fluss Feldflussfraktionierung und Zentrifugation	78
5.1.9	Oberflächenbelegung der Nanopartikel.....	79
5.2	Proteomik.....	81
5.2.1	Ingenuity Pathway Analyse	85
5.2.2	Inflammatorische Prozesse	93
5.2.3	Zellulärer Stress und reaktive Sauerstoffspezies	96
5.2.4	Gastrointestinalkrebs.....	99
5.2.5	Ubiquitinierung.....	104
6	Zusammenfassung.....	106
7	Ausblick	112
8	Abkürzungsverzeichnis	113
9	Literaturverzeichnis	116
10	Anhang	I
10.1	Tabellen.....	I
10.2	Abbildungen.....	XI

1 Einleitung

1.1 Entstehung des Begriffes *Nanopartikel*

Teilchen im Größenbereich von einigen wenigen bis mehreren 100 nm (wie z.B. Casein-Mizellen in der Milch) werden schon seit mehr als 100 Jahren im Bereich der Kolloidchemie erforscht. Der Begriff *Nanopartikel* (NP), dessen erster Wortteil sich aus dem griechischen *nanos* für Zwerg ableitet, ist eigentlich erst nach der Erfindung des Elektronenmikroskops 1981 und Rasterkraftmikroskops 1986 durch die Visualisierung dieses Größenbereichs angekommen. Eine erste Erwähnung bzw. Andeutung der Nanotechnologie kam in einem Interview mit Richard Feynman im Jahre 1959 auf (*There`s plenty of room at the bottom* [1]). Die Herstellung von Fullerenen (nanoskalige Kohlenstoffkäfige) im Jahr 1985 und die damit erhoffte Miniaturisierung von Maschinen oder einzelnen Bauteilen sorgte für einen weiteren wissenschaftlichen Anstoss der Nanotechnologie. Zunächst machte sich dann die Computerindustrie diesen Begriff zu Nutze. Diese warb mit der Vision des *molecular computing*, einer sich selbst weiterentwickelnden Computerspezies. Die Technologie, die NP für die Computerbranche interessant machte, waren in diesem Fall supraleitende *single-walled carbon nanotubes*, die ab 1993 hergestellt werden konnten und die Datenübertragung in Computern beschleunigen sollten. Mit der Einführung dieser Materialien begann die größere Beachtung der Nanoforschung. Dabei stehen vor allem die physikalischen Besonderheiten der NP im Mittelpunkt, da sie ökonomisch relevante Einsatzfelder aufzeigen.

1.2 Besondere physikalische Eigenschaften von Nanopartikeln

Zum einen besitzen NP im Vergleich zu ihren makro-skaligen Grundstoffen ein wesentlich vergrößertes Verhältnis von Partikeloberfläche zu ihrem Volumen (Abbildung 1 C). Dadurch bedingt liegen bei NP mehr Atome an der Oberfläche als beim makro-skaligen Stoff, was zu einem erhöhten energetischen Zustand und zu höherer Reaktivität führt. So zeigt z.B. Gold, welches im Bulk-Material nahezu inert ist, in nanopartikulärem Zustand katalytische Eigenschaften [2]. NP zeigen eine Aufweitung der Energieniveaus im Festkörper [3]. Diese Aufweitung verändert die optischen Eigenschaften der NP, wie Abbildung 1 B darstellt. Einen weiteren Punkt, der für die Industrie von Interesse im Zusammenhang mit NP ist, stellt die Herabsetzung des Schmelzpunktes nanoskaliger Partikel dar, die bei dem Prozess des Sinterns ausgenutzt werden, um z.B. besonders feste Eisenwerkstoffe zu erlangen (Abbildung 1 A) [3]. Durch ihre geringe Größe besitzen magnetische NP meist nur einen einzigen Weiß-

schen Bezirk, was ihre Magnetisierung deutlich erleichtert und unempfindlicher gegen Temperaturschwankungen macht [3].

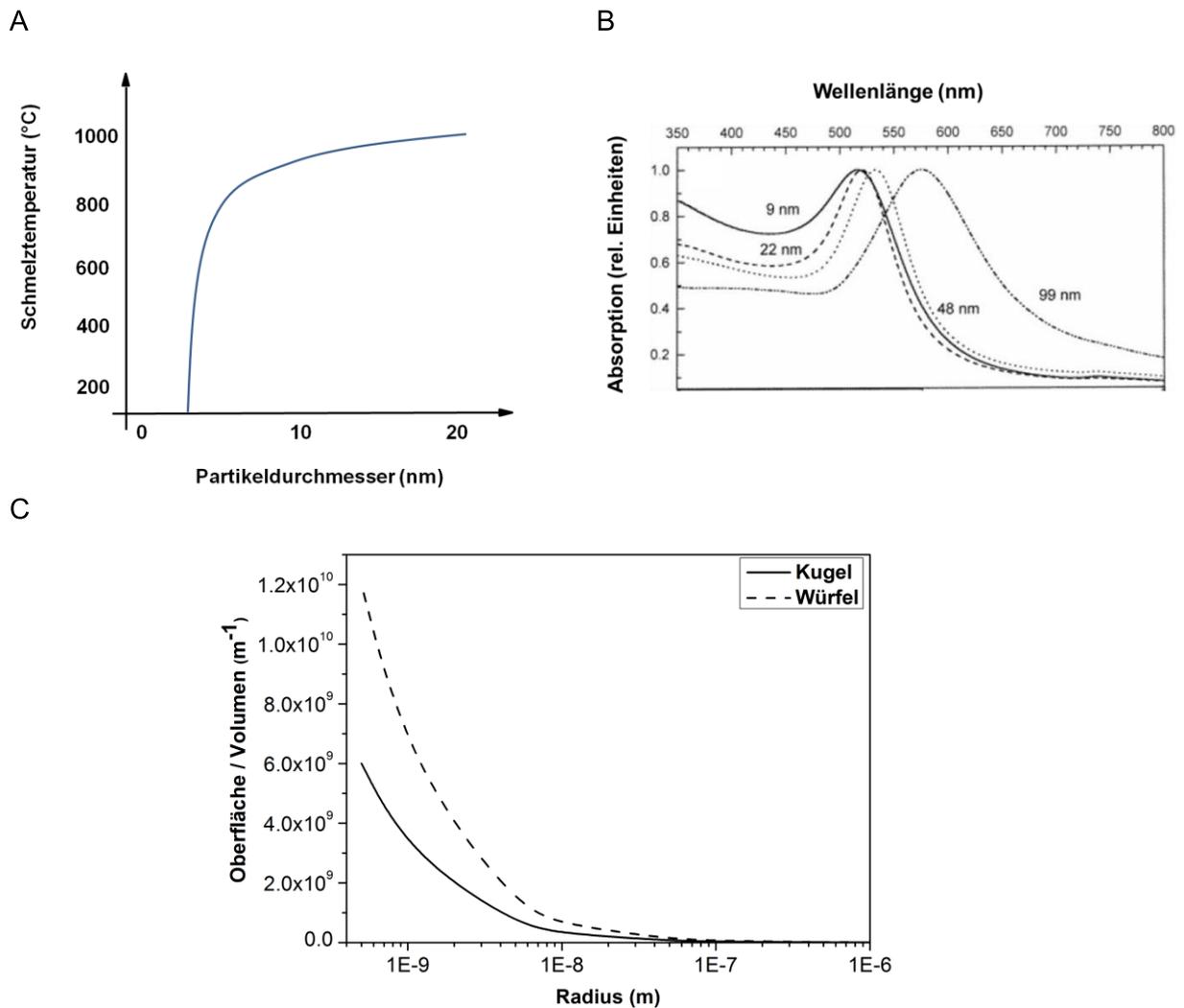


Abbildung 1: Beispiele für physikalische Eigenschaften, die NP von ihren makroskaligen Grundstoffen unterscheiden. (A) Verhältnis der Schmelztemperatur von Gold-NP zu ihrem Partikelradius, (B) Plasmonenresonanzwellenlängenverschiebung von Gold-NP bei verschiedenen Partikeldurchmessern [4], (C) Oberfläche zu Volumen Verhältnis eines sphärischen und eines würfelförmigen Partikels.

1.3 Natürliche und anthropogene Erzeugung von Nanopartikeln

Nichtsdestotrotz sind NP schon seit der Entstehung der Erde in verschiedenen Formen vorhanden, wobei der Mensch durch ihre beabsichtigte wie auch unbeabsichtigte Herstellung weitere Partikelensembles hinzufügt. NP, die ohne den Einfluss des Menschen existieren sind z.B. feinste Aschepartikel (in diesem Fall in der Form von Fullerenen und Kohlenstoffnanoröhrchen), die bei Vulkanausbrüchen bzw. Waldbränden entstehen, oder auch sehr feine Siliziumdioxid-Partikel, die durch Winderosion an Sandkörnern bei Sandstürmen z.B. in

der Wüste entstehen. Auch einige Lebewesen nutzen NP. So verbinden sich magnetotaktische Bakterien, die Eisenoxid-NP (in diesem Fall Magnetit) enthalten, zu langen Ketten, die es ihnen ermöglichen, mit Hilfe des Erdmagnetfeldes neue Wasserströmungsschichten und damit neue Nahrungsregionen aufzusuchen [5]. In wässrigen Systemen wird der Begriff Kolloid für dispergierte Partikel im Größenbereich von Nanometern verwendet. In diesem Bereich sind vor allem die in Gewässern vorkommenden makromolekularen organischen Moleküle Humin- und Fulvosäuren zu nennen. In Böden kommen NP in Form von Tonmineralen in den Weltmeeren durch Verwitterung von Gestein vor [5, 6].

NP wurden von Menschen bei der Photographie schon vor mehr als 100 Jahren bei der Belichtung von Bildern mittels Bildung von Silberkeimen unbewusst genutzt. Eine weitere unbeabsichtigte Nutzung von NP ist aus der Antike bekannt, als z.B. die Griechen und Perser Wasser möglichst in Gefäßen aufbewahrten, die Silbermünzen enthielt, deren Silberionen, aber auch durch Reduktion entstehende NP, das Wasser als Bakterizid frisch hielten [7]. Ebenso ist die Bruchfestigkeit von Damaszener-Stahl auf Kohlenstoffnanoröhren zurückzuführen oder die Farbe vieler Kirchenfenster aus dem Mittelalter auf kolloidales Gold [5].

Menschliche Quellen unbeabsichtigter NP-Produkte oder Kontaminationen sind z.B. Dieselrußpartikel sowie nanopartikuläre Staubpartikel aus Industrieabgasen. Aggregate von Kohlenstoff-Nanopartikeln befinden sich als stabilisierende Bestandteile in Autoreifen und werden durch Abrieb beim Fahren und Bremsen wieder an die Umwelt abgegeben. Allgemein kann gesagt werden, dass ein menschlicher Eintrag von NP in die Umwelt auf vielfältigem Wege erfolgen kann. Im Folgenden ist eine kleine Auswahl an Produkten oder Prozessen, in denen NP verwendet werden und aus denen diese entweichen können, tabellarisch dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1 Auswahl an heutigen Einsatzfeldern von NP.

Nanopartikelmaterial	Art der Verwendung bzw. Entstehung
Aluminiumoxid	in Folien als Separatoren in Lithium-Akkus
Silber	bei der Färbung von Photos (zu Beginn der Photographie im 19. bis Anfang des 20. Jahrhunderts), in Waschmaschinen, Schneidbrettern, Medizinprodukten und Kleidungsstücken als Bakterizid
Palladium	Katalysator für z.B. Autoabgase
Siliziumdioxid	Halbleitertechnik, Photovoltaik, als Rieselhilfe in Lebensmitteln
Titandioxid	als Farbstoff in Wandfarben aber auch in Zahnpasta; in Sonnencremes als UV-Filter
Zinkoxid	als UV-Filter in Sonnencremes
Eisenoxide	als MRT Kontrastmittel in der Radiologie; als Lebensmittelfarbstoff

Die Anzahl der Patente für Produkte, die NP enthalten bzw. NP bei ihrer Herstellung nutzen, hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen [8]. Zu diesen zählen auch etliche Produkte, die entweder als Nahrungsmittel absichtlich NP enthalten oder eine Kontamination von Nahrungsmitteln mit NP durch Kontakt (z.B. Migration aus Schneidebrettern und Kleidung) ermöglichen. Eine zunehmende Verwendung von NP in Verbraucherprodukten, vor allem auch Nahrungsmitteln, erfordert also eine Risikobewertung dieser Partikel nicht nur in Hinsicht auf ihre mögliche Human-, sondern auch ihrer Ökotoxizität. 2011 gehörten 7.5 % der beim amerikanischen *Woodrow Wilson International Center for Scholars* (WWIC) registrierten NP-haltigen Konsumgüter in den Lebensmittelbereich, zu dem auch Produkte gehören, die mit Nahrungsmitteln in Kontakt kommen können. Die Tendenz zunehmender NP-Produkte im Lebensmittelsektor macht eine Einschätzung ihrer intestinalen Aufnahme und möglichen Toxizität notwendig. Die Datenbank des WWIC deckt zwar nur solche Produkte ab, die entweder durch Eigenrecherche des Instituts, offizielle (US-Amerikanische) Behörden oder durch freiwillige Datenherausgabe der Hersteller bekannt sind, doch umfasst diese Datenbank auch ausländische (z.B. deutsche) NP-Produkte. Auch in Europa gibt es Bestrebungen, Datenbanken dieser Art zu etablieren, sei es durch die EU [9], oder die Chemische Industrie [10].

1.4 Klassifikation der Nanopartikel

Nachdem Definitionen zu Nanomaterialien und NP in den USA und England schon 2006 bzw. 2007 eingeführt wurden [11, 12], hat die EU mit der Verordnung 1169/2011 eine erste allgemeine europäische Definition von *Nanomaterialien* in Lebensmitteln geschaffen, die für sämtliche Regelungszwecke innerhalb der EU genutzt werden soll [13]. Diese beschreibt Nanomaterialien 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*“. Im Zuge dieser Verordnung könnten Lebensmittel ab 2014 mit einem Zusatz deklariert werden müssen, der auf die Nanomaterialien des Produktes hinweist. Die Deklaration von Nanomaterialien ist zum einen hinsichtlich ihrer nicht trivialen Detektion in teilweise komplexen Matrices wie Lebensmitteln schwierig. Zum anderen würde diese novellierte Deklaration auch Produkte mit z.B. Mizellen in ähnlichen Größenordnungen (Fett in Milch bzw. in Cremes) betreffen und damit neue Bewertungskriterien für Lebensmittel schaffen.

1.5 Einsatzgebiete und potentielle Risiken von Silber Nanopartikeln

Trotz dieser Fortschritte auf rechtlicher Ebene beziehen sich nachfolgende Statistiken aufgrund derzeit fehlender europäischer Daten auf die vom WWIC ermittelten Ergebnisse. Demnach ist Silber das am häufigsten verwendete NP-Material aller registrierten NP-Produkte (etwa 23 %). Ähnlich große Verbreitung (22 %) erfährt Silber auch im Bereich der Nahrungsmittelprodukte [14]. Silberionen oder kolloidales Silber werden heutzutage nicht nur wegen ihres schon im antiken Griechenland empirisch genutzten antimikrobiellen Effekts eingesetzt [7], sondern als industrielle Ag-NP gezielt in zunehmendem Maße in Nahrungsergänzungsmitteln verwendet, die mit variierendem gesundheitlichen Nutzen beworben werden (z.B. Erholung von Malariasymptomen oder gegen verschiedenste Infektionskrankheiten [14]).



Abbildung 2: Einsatzgebiete von Silbernanopartikeln, die von Zahnpasta über Nahrungsergänzungsmittel bis zu Kochgeschirr reichen [15].

Wissenschaftlich eindeutig belegt sind heutzutage lediglich die antimikrobiellen Wirkungen der Ag-NP [16-18] vorwiegend bei äußeren Anwendungen, wohingegen gesundheitsfördernde Aspekte, mit Ausnahme der Nutzung in Wundpflastern oder Implantaten [19], bislang nicht eindeutig bestätigt werden konnten. Im Gegenteil dazu gibt es wissenschaftliche Belege zu pathologischen Auswirkungen einer oralen Langzeitexposition von Silber-NP (Ag-NP),

die zu Argyrie führen kann [20]. Andere gesundheitliche Folgen von NP-Expositionen, in diesem Fall sowohl Silber- als auch Silika-NP, könnten Amyloidosen wie z.B. Alzheimer sein [21], die durch von NP begünstigte Proteinfehlfaltungen entstehen [22, 23]. Die Vielzahl an Charakteristika (Stabilisatormaterial, Größe, Form etc.) der heutzutage verwendeten NP und die damit verbundenen Unterschiede bezüglich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften (Leitfähigkeit, magnetische Eigenschaften, Schmelztemperaturen etc.) wirken sich ebenfalls auf deren Toxikokinetik und Toxikodynamik in Zellkulturexperimenten und damit wahrscheinlich auch im menschlichen Körper aus [24-26].

Im Falle der Silber-NP gibt es einen breiten wissenschaftlichen Konsens bezüglich ihrer Haupttoxizität, der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wobei diese entweder bedingt durch Oberflächeneigenschaften der NP oder Freisetzung von Silberionen generiert werden können. Dabei reagieren Elektronen-Donoren (z.B. unedle Metalle) mit Sauerstoff- bzw. Hydroxyl-Ionen über Disproportionierung oder Fenton-Reaktionen zu Hyperoxid- bzw. Hydroxylradikalen, die dann neue ROS erzeugen [27, 28]. Die entstandenen ROS induzieren dann unter anderem Apoptose in eigentlich gesunden Zellen. Sollte keine Apoptose induziert werden, könnten Schädigungen der DNA folgen, die langfristig Krebs auslösen können. In diesem Zusammenhang unterscheiden die meisten Autoren auch zwischen der durch die Ag-NP freigesetzten Ionen und der durch die NP hervorgerufenen Toxizität. Dennoch konnten Kim *et al.* zeigen, dass die Zytotoxizität von deionisierten Ag-NP auf HepG2-Zellen unabhängig von der freier Silberionen aus AgNO₃ (SN) ist, wobei sie zum Vergleich die unterschiedliche Deregulation von Genen, deren Proteine in Verbindung zu oxidativem Stress stehen, heranzogen [29]. Leber und Niere, als Akkumulationsorgane von NP jeglicher Art, zeigten erhöhte Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie den Interleukinen (IL) (z.B. IL-1, IL-6 und IL-12) nach einer hoch dosierten oralen Applikationsstudie an Imprinting Control Region (ICR)-Mäusen [30]. Demgegenüber steht eine 28-Tages-Studie mit Sprague-Dawley Ratten, denen ebenfalls hohe Dosen, sowohl PVP-stabilisierter NP als auch AgPureTM, oral verabreicht wurden und deren Blut weder signifikant erhöhte Aspartat-Transaminase (AST) noch Alanin-Transaminase (ALT) aufwies, welche auf eine Schädigung der Leber hindeuteten. Ebenso wenig konnte eine erhöhte Konzentration der Zytokine IL-1 und IL-6 festgestellt werden. Zusätzlich zeigte sich bei diesem Versuch keine Präferenz für ein bestimmtes Organ bei der Akkumulation der NP bzw. des Silbers selbst [31].

Analysen der Gen-Expression einer Co-Kultur eines *in-vitro* Modells des Dünndarms ergaben keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Behandlung mit vier verschiedenen großen Ag-NP und Silberionen aus SN. Zwar zeigten sich in den Behandlungsgruppen, die allein mit den aus den NP freigesetzten und anschließend extrahierten Silberionen behandelt

wurden, leichte Überexpressionen von Genen, die mit der Generierung von oxidativem Stress in Verbindung stehen (FOSB, FOSL1, JUNB), doch wurde dies nicht als signifikant angesehen [32]. Andere Veröffentlichungen unterstützend, wurde eine größenabhängige Toxizität der Ag-NP festgestellt [33, 34]. Demgegenüber zeigte eine 24 h Expositionsstudie von Caco-2 Zellen mit dem Überstand von 24 h in Wasser suspendierten peptidbeschichteten NP erst bei einer Partikelkonzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ einen zytotoxischen Effekt, während die NP selbst diesen bereits ab einer Konzentration von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ zeigten [35]. Entsprechend übereinstimmender Ergebnisse von NP-Toxizitätsstudien bestimmen hauptsächlich die physikochemischen Eigenschaften der NP, wie z.B. Oberflächenladung, Form oder Größe, ihre Toxikokinetik und Toxikodynamik [24, 36]. Diese Eigenschaften variieren sowohl durch die Umgebungsmedien der entsprechenden experimentellen Fragestellungen (*in vitro*, *in vivo*, künstlicher Verdau) als auch bedingt durch die Dauer der Versuche und der damit verbundenen Freisetzung von Silberionen [37, 38]. Die Relevanz der Partikeleigenschaften in Bezug auf ihre mögliche Toxizität erfordert ihre umfassende Charakterisierung vor und während der angestrebten Versuchsbedingungen [39], denn diese Charakteristika bestimmen Eigenschaften wie z.B. das Adsorptionsverhalten von Proteinen an NP und damit auch ihre Verweildauer im jeweiligen Organismus [40]. Bei *in-vitro* Versuchen werden die NP vor der Zellexposition in ZKM dispergiert, welches sowohl die Oberfläche der Partikel modifiziert als auch die Interaktion zwischen benachbarten Partikeln bzw. Partikeln und Zellen beeinflusst [37, 38, 41]. Die Proteinadsorption aus ZKM kann diverse Veränderungen der physikochemischen und toxikologischen Eigenschaften mit sich bringen, welche dann nicht mehr direkt mit denen der unbehandelten NP in Verbindung gebracht werden können. Die Adsorption von Proteinen führt zur Bildung einer sogenannten Proteinkorona [37, 41], die abhängig von der Adsorptionskinetik und der Konzentration der verschiedenen Proteine als harte und weiche Korona betitelt wird [37, 42]. Diese Korona ändert z.B. den hydrodynamischen Radius (R_H) der Partikel, womit Techniken wie die Dynamische Lichtstreuung (DLS) und die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zur Charakterisierung eingesetzt werden können [38, 43, 44]. Die Untersuchung möglicher Agglomeration bzw. Aggregation der Partikel ist sowohl mit DLS als auch TEM nicht adäquat möglich, da zum einen die DLS-Anwendung von sphärischen Partikeln ausgeht und zum anderen bei der Probenpräparation für die TEM bereits Agglomerate entstehen können. Zudem bedarf es eines großen zeitlichen Aufwands, um eine statistisch signifikante Auswertung von TEM-Bildern zur Größenverteilung der beobachteten Partikel zu erreichen, weshalb es an entsprechenden Daten mangelt [45]. Nicht nur der vergrößerte R_H , sondern auch die Veränderung der Oberflächenbelegung durch Proteine und Aminosäuren verändert die Interaktion der NP mit einem *in-vitro* Zellmodell. So wurde die Aufnahme von Polystyrol-NP in HeLa Zellen durch die Adsorption von bovinem Serum-Albumin verringert [46]. Im Falle von AgPure NP konnten Böhmert *et al.* zeigen, dass

sich nach einem künstlichen Verdau der NP deren Zytotoxizität auf Caco-2 Zellen nicht wesentlich von den nicht verdauten NP unterschied, obwohl die Partikel eine Proteinkorona ausbildeten [47]. Auch die Stabilisatoren selbst können Einfluss auf die Interaktion der NP mit Zellsystemen nehmen. Polystyrol Nanokapseln, die in nichtionischem Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween20TM) mit einer Konzentration zwischen 0.0025 % und 0.05 % dispergiert waren und eine Tween-Korona entwickelten, zeigten z.B. eine höhere Affinität zu Zellmembranen der Caco-2 Zellen als die unbehandelten Partikel [48]. Zudem stellte sich in eben dieser Arbeit heraus, dass Tween20 allgemein die Zellviabilität und die Proliferationsrate der Caco-2 Zellen mindert. Ahamed *et al.* konnten bei verschiedenen Zelltypen zeigen, dass mit Polysacchariden stabilisierte Ag-NP eine höhere Zytotoxizität aufweisen als solche, die nur elektrostatisch stabilisiert sind [36]. Diese Beispiele zeigen den Einfluss der Stabilisatoren auf die NP-Toxizität, doch auch die Freisetzung von Silberionen durch die Ag-NP ist ein entscheidender Punkt bei der Bewertung ihrer Toxizität. Diesem Effekt wird in wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema bislang der höchste Einfluss auf die Toxizität von Ag-NP durch die Induktion von oxidativem Stress und nachfolgender Apoptose in verschiedenen Zellsystemen eingeräumt [49-51]. Neben diesen Befunden gibt es jedoch auch Arbeiten, die eine synergistische toxische Wirkung von NP und Ionen annehmen [32, 43, 52]. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien machen deutlich, dass einem Einsatz von NP jeglicher Art in Zellkulturexperimenten (oder auch *in-vivo* Studien) eine umfassende physikochemische Charakterisierung vorausgehen muss.

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die physikalisch-chemische Charakterisierung der kommerziellen Ag-NP, sowohl unter originalen Bedingungen als auch unter Zellkulturbedingungen in ZKM-Dispersion stellte den ersten Teil der Arbeit dar. Dafür wurden Ag-NP ähnlichen Partikelkerndurchmessers aber mit unterschiedlicher Oberflächenstabilisierung gewählt (AgPure, Nanocomposix). Die Charakterisierung der NP einschließlich ihrer möglichen Proteinkorona in ZKM erforderte in diesem Zusammenhang eine Trennmethode, die die Oberfläche der Partikel nicht beeinträchtigt und zusätzlich keine Agglomeration bzw. Aggregation fördert. Für diese Aufgabe wurde daher die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (A4F) eingesetzt. Der Separation der NP folgte eine zerstörungsfreie Analytik der Partikeldimensionen, die mittels DLS und SAXS sowohl den R_H als auch den Partikelkern abdeckt, wobei mit der SAXS zusätzlich Aggregationen erkannt und quantifiziert wurden. Da die bisher beschriebenen Analysemethoden eine Proteinkorona nur rechnerisch ermitteln, wurde als bildgebendes Verfahren noch die Elektronenmikroskopie genutzt. Von den mit der A4F gereinigten NP-Dispersionen wurden TEM

Aufnahmen durchgeführt und zusätzlich EDX-Analysen durchgeführt, um die chemische Zusammensetzung der Korona zu ermitteln. Da die Ionenfreisetzung der NP signifikanten Einfluss auf deren Toxizität hat, wurde die Ionenkonzentration der Dispersionen nach Dialyse mittels ICP-MS untersucht. Alternativ wurden die undialysierten Dispersionen mit Hilfe der UV-Vis Spektroskopie auf ihren Ionenanteil untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den molekularen Wirkungen von kommerziell erhältlichen Ag-NP im Vergleich zu freien Silberionen auf das Proteom eines humanen Dünndarmzellmodells (Caco-2). Dafür wurden die Zellen mit unterschiedlichen, nicht zytotoxischen, Konzentrationen von Ag-NP und Silberionen aus SN für 24 h exponiert. Anschließend wurde nach 2-D Gelelektrophorese und anschließender qualitativer MALDI-Massenspektrometrie Auswertung der deregulierten Proteine die proteomische Antwort der Caco-2 Zellen mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ermittelt. Aus den IPA-Daten wurden mögliche Beziehungen zwischen den zuvor ermittelten NP-Eigenschaften und ihrer Toxikodynamik in den Caco-Zellen gebildet. Die beschriebenen analytischen Vorgehensweisen sind in Abbildung 3 zur besseren Veranschaulichung dargestellt.

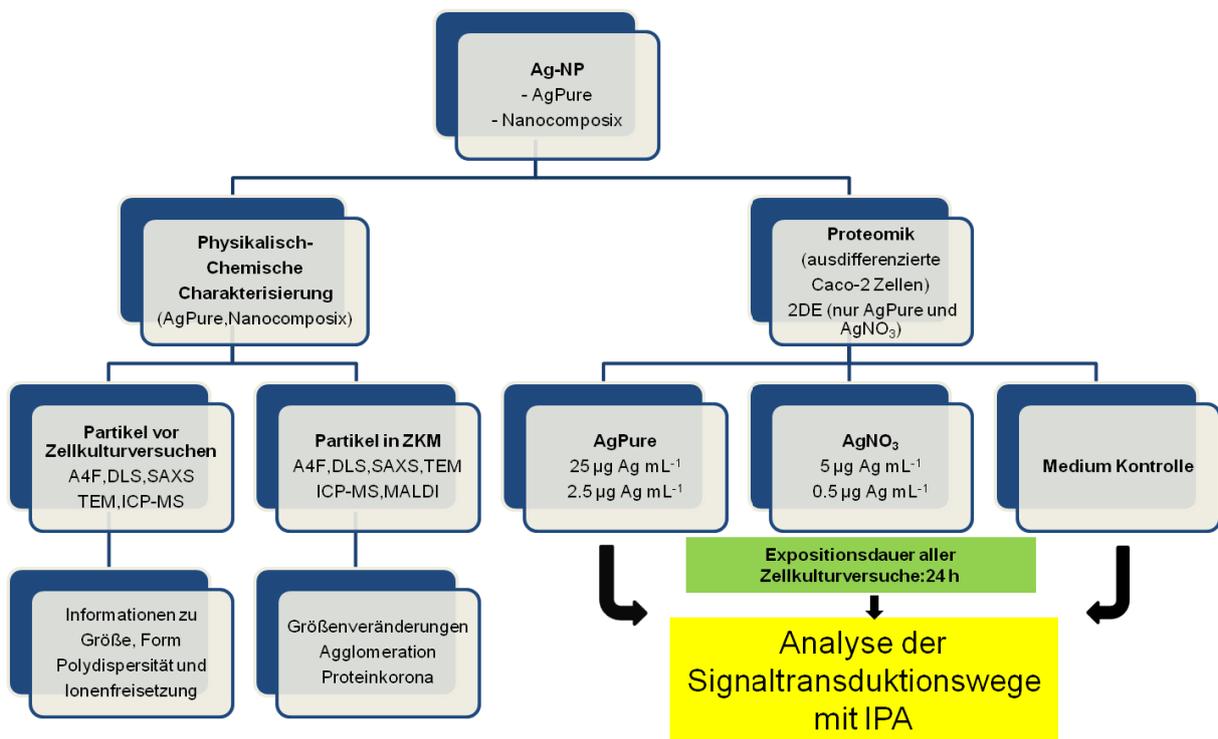


Abbildung 3: Arbeitsschema dieser Dissertation. Beide Nanopartikel (AgPure, Nanocomposit) wurden sowohl vor Exposition mit ZKM als auch danach physikochemisch charakterisiert. Für die Zellkulturversuche wurde jedoch nur AgPure verwendet, da dies ein von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung angebotenes Referenzmaterial darstellt. Als Vergleich dient in diesem Fall SN. Die Signaltransduktionswege wurden nach MALDI-Analytik der deregulierten Proteine aus den Zellkulturexperimenten mittels IPA Auswertung erhalten.

3 Theorie

3.1 Feldflussfraktionierung

Die Methode der Feldflussfraktionierung (FFF) wurde 1966 von Prof. Calvin Giddings und seinen Mitarbeitern an der Universität Utah (Salt Lake City, USA) erfunden. Sie ermöglicht die Trennung von Teilchen im Bereich weniger nm bis hin zu mehreren Mikrometern (z.B. Zellen [53]) aufgrund ihrer unterschiedlichen R_H . Das Prinzip der Trennung in einer FFF ist der Chromatographie ähnlich, wobei bei der FFF keine stationäre Phase zur Anwendung kommt. Stattdessen wird der Analyt in der mobilen Phase (Laufmittel) in einem flachen Trennkanal mit einer Höhe von einigen 10 bis 100 μm zunächst in einem schmalen Band fokussiert. Die Einleitung der Analyten kann dabei entweder durch manuelle Injektion oder mittels computergesteuerter Pumpensysteme aus einem Reservoir erfolgen. Die Form des Trennkanals sorgt für ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil des laminaren Laufmittelflusses, dessen Fließgeschwindigkeit meistens im Bereich weniger mL min^{-1} liegt. Nach der Fokussierung erfolgt je nach FFF-Variante durch die Einwirkung äußerer Kräfte (z.B. Sedimentations-FFF (Zentrifugalkraft), Thermische-FFF (Temperatur), SPLITT-FFF (Gravitation)) oder durch Einwirkung eines zweiten, senkrecht überlagerten, Flusses (Fluss-FFF, Asymmetrischer Fluss-FFF) eine Retention der Analyten rechtwinklig zu ihrer Transportrichtung. Einen umfassenderen Überblick über gängige FFF-Typen liefert z.B. das Field-Flow-Fractionation Handbook [54]. Die Trennung der Analyten erfolgt im Normalmodus größenabhängig aufgrund unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten, wobei kleinere Partikel mit einem größeren Diffusionskoeffizienten früher eluieren als große Partikel, was die Methode von der Gelpermeationschromatographie (GPC) unterscheidet. Der Normalmodus gilt für Partikel mit Durchmessern von ca. 2-5 nm bis einigen 100 nm [55]. Die Reihenfolge der Elution kann sich, bedingt durch verschiedene Modi der FFF, jedoch auch umkehren. Als Beispiele für diesen Elutionsmodus sind vor allem die *sterische Elution* sowie die *lift/hyperlayer* Methode bei Teilchen mit einem Durchmesser von mehr als 1 μm zu nennen [54]. Vorteile der FFF im Vergleich zu Methoden mit ähnlichem Auflösungsvermögen (z.B. GPC oder Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)) sind dabei die oberflächenschonende Trennung der Analyten durch das Fehlen von sowohl Scherkräften als auch Wechselwirkungen mit einer stationären Phase. Diese Eigenschaften sind z.B. bei der Analytik einer Proteinkorona bei NP wünschenswert. Ein Nachteil ist jedoch die relativ hohe Verdünnung des Analyten, welche nachfolgende Analysen erschweren kann.

Am Ende des Trennkanals können die mit unterschiedlichen Retentionszeiten austretenden Analyten dann direkt, auch mit mehreren gekoppelten Analysatoren, charakterisiert werden. Für Größenbestimmungen kleinerer Moleküle (wenige nm bis einige 10 nm) eignen sich z.B. die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) oder die Dynamische Lichtstreuung (DLS), bei größeren Molekülen (mehrere 100 nm bis μm) z.B. die Statische Lichtstreuung (SLS). Zur Molmassenbestimmung von Polymeren können Brechungsindex (RI)-Detektoren verwendet werden oder für Aussagen bezüglich des Analytmaterials Ultraviolettlichtabsorptions (UV)- oder Infrarotlichtabsorptions (IR)-Detektoren bzw. Massenspektrometer, die an das FFF-System gekoppelt werden können.

3.1.1 Asymmetrischer Fluss Feldflussfraktionierung (A4F)

Der schematische Aufbau eines A4F-Trennkanals ist in Abbildung 4 dargestellt. Das eingespeiste Probenvolumen kann an die Konzentration des Analyten angepasst werden. So ist es z.B. möglich, mittels einer Probenkapillare, die über ein Ventil an den Laufmittelzufluss angeschlossen wird, Probenvolumina von mehreren Litern während der Fokussierung zu injizieren, um den Analyten anzureichern [56].

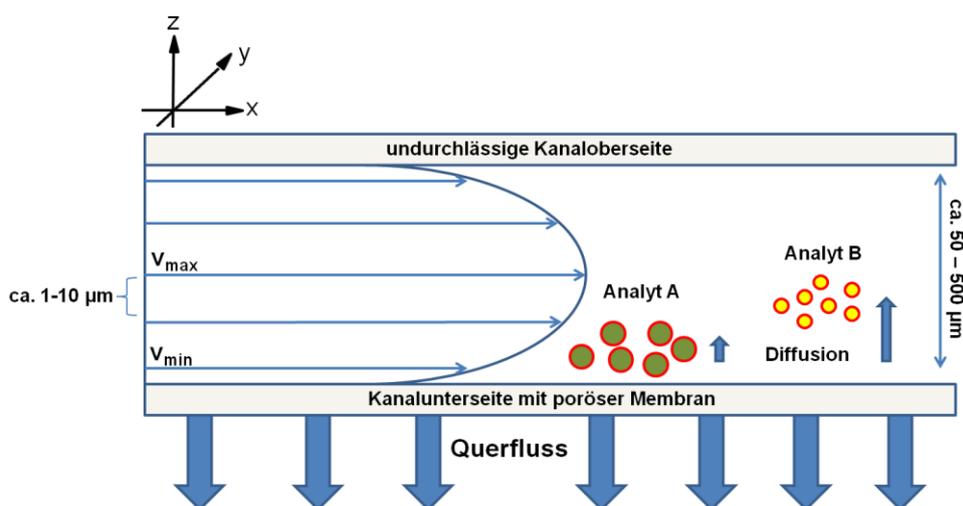


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Trennkanals einer A4F-Anlage (Seitenansicht). Kanalober- und unterseite sind durch einen Spacer getrennt, der die Dimensionen des Trennkanals bestimmt. Der Querfluss wird durch den Rückdruck erzeugt, der durch einen geregelten Abfluss des Solvens am Ende des Trennkanals ausgebildet wird. Die Kanalunterseite besteht aus einer porösen Membran, deren Material jeweils an die chemischen Eigenschaften der zu trennenden Komponenten und des Lösemittels anzupassen ist. Unter der Membran befindet sich eine Fritte zur Stabilisierung der Membran, durch die der Querfluss geleitet wird. Die Analytinjektion erfolgt in den Solvensfluss.

Nachdem der Analyt in einem mit den Materialien der A4F kompatiblen Solvens suspendiert, bzw. gelöst wurde, erfolgt die Injektion in den laminaren Solvensfluss entweder über einen

automatischen Probeninjektor oder manuell. Dabei ist dafür Sorge zu tragen, dass die Konzentration des Analyten im Trennkanal während der Fokussierung nur so hoch gewählt wird, dass eine Wechselwirkung zwischen einzelnen Analytmolekülen vernachlässigbar gering ist. Andernfalls droht eine Agglomeration von Analytmolekülen, was zu einer falschen Retentionszeit und einer Verschiebung der Verteilung innerhalb des Konzentrationsprofils in z-Richtung führen würde. Zudem könnte es im Zuge der Aggregationen auch dazu kommen, dass Analytmoleküle mit der Kanalunterseite (oder auch Akkumulationswand) in Wechselwirkung treten, da die erhöhten R_H der Agglomerate nach der Stokes-Einstein-Gleichung mit einem verringerten Diffusionskoeffizienten einhergehen, wie sich aus Gleichung 1 ergibt.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (1)$$

Der Analyt wird nach der Injektion zum einen durch den Solvensfluss in den Trennkanal geführt und zum anderen durch den entgegengesetzt gerichteten Fokusfluss im vorderen Bereich des Kanals zu einem in x-Richtung schmalen Konzentrationsprofil ausgerichtet (Abbildung 5). Die Eigendiffusion der verschiedenen Komponenten des Analyten bewirkt zusätzlich eine Trennung nach R_H in z-Richtung, was einen Konzentrationsgradienten zur Folge hat (Abbildung 5). Dieser bildet sich nach ausreichender Fokussierungszeit durch Erreichen eines Gleichgewichtszustandes zwischen der Eigendiffusion der Analytkomponenten und den ihr entgegenwirkenden Querflusskräften aus.

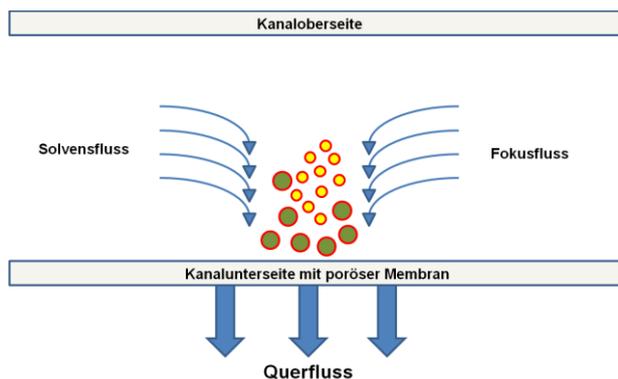


Abbildung 5: Fokussierung des Analyten im A4F Trennkanal. Solvensfluss und Fokusfluss sorgen für eine Akkumulation des Analyten in einem schmalen Band in xy-Richtung und einer Trennung der Analytbestandteile nach R_H in z-Richtung.

Dieser Konzentrationsgradient (das Verhältnis der Analytkonzentration nahe der Akkumulationswand c_0 und der Konzentration c an der Stelle x über der Wand) nimmt exponentiell zur Kanalmitte hin ab (Gleichung 2).

$$c(x) = c_0 e^{\left(\frac{-x}{l}\right)} \quad (2)$$

Die Variable l steht für die Ausdehnung der jeweiligen Analytkomponente in z -Richtung. Diese Ausdehnung lässt sich über die Diffusionskoeffizienten D der Komponenten im Verhältnis zur Kraft des äußeren Feldes $|U|$, in diesem Fall dem Betrag der Querflussgeschwindigkeit, herleiten (Abbildung 6).

$$l = \frac{D}{|U|} \quad (3)$$

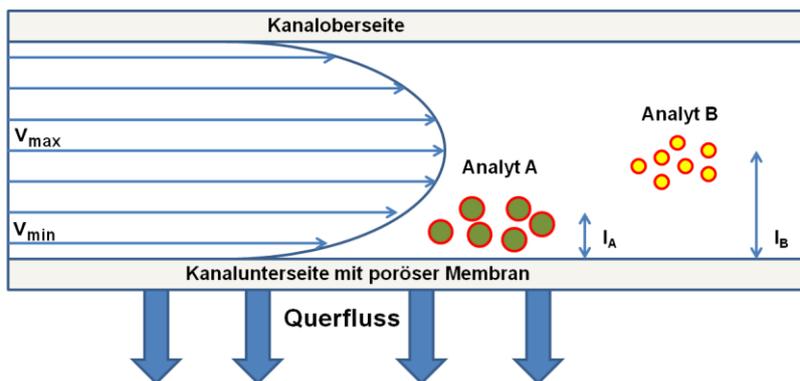


Abbildung 6: Veranschaulichung der Lage unterschiedlicher Analyten mit unterschiedlichen RH (dargestellt durch l_A und l_B) im Trennkanal nach der Fokussierung.

Sobald der Fokusfluss zurückgefahren wird, können die Komponenten mittels des Solvensflusses den Kanal passieren. Die Fließgeschwindigkeit $v(x)$ des Solvens an der Position x im Kanal, abhängig von der Höhe des Kanals w und der mittleren Strömungsgeschwindigkeit v , ist gegeben durch Gleichung 4. Diese gilt jedoch streng genommen nur unter der Annahme eines unendlich langen Trennkanals, sowie keiner Beeinträchtigung des Flusses durch die Analytkonzentration.

$$v(x) = 6\langle v \rangle \left[\frac{x}{w} - \left(\frac{x}{w} \right)^2 \right] \quad (4)$$

Der resultierende Fluss der jeweiligen Analytkomponenten in x-Richtung J_x entsteht durch die Kombination des Feldes in Richtung der Akkumulationswand U_x (der Kanalunterseite) und der entgegengesetzt wirkenden Eigendiffusion der Komponenten abhängig vom Konzentrationsprofil $\frac{dc(x)}{dx}$ (Gleichung 5). Im Gleichgewicht ist der resultierende Fluss $J_x = 0$.

$$J_x = U_x c(x) - D \frac{dc(x)}{dx} \quad (5)$$

Zur Bestimmung des Retentionsverhältnisses wird zusätzlich die mittlere Geschwindigkeit v_{zone} der Analytkomponente in der jeweiligen Strömungszone des laminaren Solvensflusses unter dem Einfluss des Querflusses benötigt und ist folgendermaßen definiert:

$$v_{zone} = \frac{\langle c(x)v(x) \rangle}{\langle c(x) \rangle} \quad (6)$$

Das Retentionsverhältnis R berechnet sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeit in einer bestimmten Strömungszone v_{zone} zur mittleren Geschwindigkeit des Solvens v .

$$R = \frac{v_{zone}}{\langle v \rangle} = \frac{\langle c(x)v(x) \rangle}{\langle c(x) \rangle \langle v(x) \rangle} \quad (7)$$

Zur Definition des Abstandes des Schwerpunktes der Analytkomponente von der Akkumulationswand wird der dimensionslose Parameter λ eingeführt, wobei gilt:

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{D}{|U|w} \quad (8)$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung 2 ein und nutzt dann diese neu entstandene Gleichung sowie den Ausdruck für $v(x)$ in Gleichung 7, so kann nach Integration folgender Ausdruck für R erhalten werden.

$$R = 6\lambda \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 12\lambda^2 \quad (9)$$

Die Retentionszeit wird durch den Vergleich der Kanalpassierdauer t_0 einer nicht verzögerten Analytkomponente mit der Passierdauer t_r einer durch den Querfluss beeinflussten Komponente erhalten.

$$R = \frac{t_0}{t_r} \quad (10)$$

Bei einer FFF Trennung kann nicht von einem Gleichgewicht zwischen Eigendiffusion und entgegengesetzter Kraft durch den Querfluss, wie in Gleichung 4 beschrieben, ausgegangen werden. Stattdessen kommt es bei der Aufnahme der Eluentensignale am Ende des Trennkanals zu Peakverbreiterungen. Diese Verbreiterung des Konzentrationsprofils $c(x)$ ergibt sich durch das 2. Ficksche Gesetz der instationären Diffusion für den Fall der Diffusion in z -Richtung (parallel zum Solvensfluss) zu:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c}{\delta z_l^2} \quad (11)$$

Die Gleichung enthält neben der Konzentration c , der Zeit t und dem Diffusionskoeffizienten D auch z_l , welches für $z - (v_{zone}t)$ steht. Für einen monodispersen Analyten ergibt die Lösung der Gleichung 12 ein Gaußprofil.

$$c = \frac{n}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{z_l^2}{4Dt}\right) = \frac{n}{\sqrt{4Dt}} \left[\frac{(z - v_{zone}t)^2}{4Dt} \right] \quad (12)$$

Die Varianz dieses Profils wird aus der Einstein-Diffusions-Gleichung mit $\sigma^2 = 2Dt$ bestimmt. Abweichungen von den Idealbedingungen der Monodispersität des Analyten oder der Wechselwirkung von Analyt und Kanalmembran führen zu weiteren Verbreiterungen der entstehenden Peaks. Da zudem die Diffusion gelöster Teilchen temperaturabhängig ist, können sich auch durch Temperaturgradienten Peakverbreiterungen ergeben.

Bei hohen Querflüssen wird der Übergang zur sterischen Elution zu kleineren Teilchen verschoben. Diese sorgt zum einen dafür, dass die großen Analytkomponenten vor den kleinen eluieren, und zum anderen durch die Interaktion mit der Kanalmembran veränderte Peaks bei der Analytik entstehen (Abbildung 7).

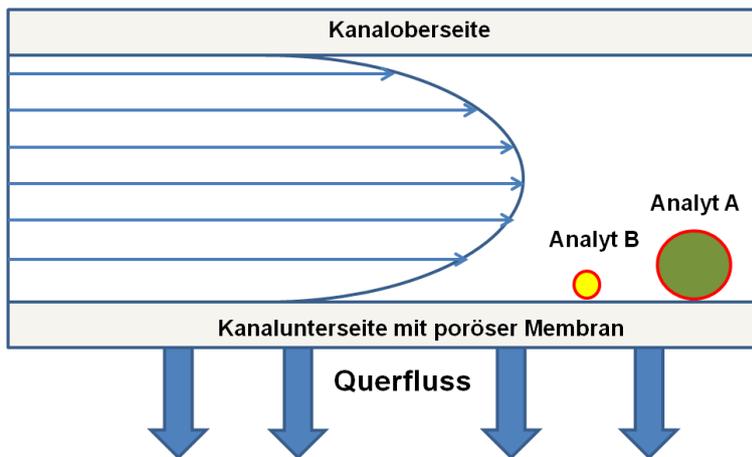


Abbildung 7: Darstellung der sterischen Elution. Die Diffusion von Analyt B reicht bei entsprechend hohem Querfluss nicht aus, um in schnellere Bereiche des parabolischen Solvensflusses vorzudringen. Durch seine Größe befindet sich Analyt A in schnelleren Bereichen des Solvensflusses, erfährt somit einen stärkeren Auftrieb und wird vor Analyt B eluiert.

Bei Partikeln $\sim 1 \mu\text{m}$ kann die Methode der Lift-Hyperlayer-Trennung genutzt werden. Hierbei eluieren ebenfalls zunächst die größeren Partikel. Hervorgerufen wird dies durch die Umströmung der Partikel und dem damit hervorgerufenen dynamischen Auftrieb durch den Coanda-Effekt [57], der auch an Flugzeugtragflächen wirkt (Abbildung 8). Je mehr Oberfläche eines Partikels sich hierbei in Regionen höherer Solvensflussraten befindet, also mit steigendem R_H , desto größer ist der Auftrieb, da auch die Kraft des Solvensstromes zur Kanalmitte hin zunimmt. Hyperlayer und sterische Elution können bei ähnlichen Partikeldimensionen eingesetzt werden, eine Abgrenzung ist durch die Stärke des Querflusses möglich, die bei der sterischen Elution höher sein muss.

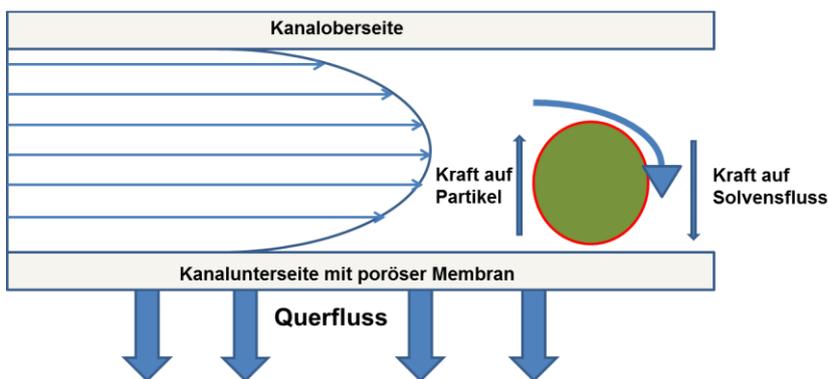


Abbildung 8: Entstehung des Hyperlayer-Modus bei der A4F. Das Solvens umspült den Partikel (hier stark vergrößert dargestellt) und wird durch den Coanda-Effekt an der Oberfläche entlang Richtung Kanalmembran geführt. Nach dem ersten Newtonschen Gesetz muss auf den Partikel eine entgegengesetzte Kraft zu der des Solvens wirken, die das Partikel dadurch anhebt.

3.2 Streuexperimente

3.2.1 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Röntgenkleinwinkelstreuung dient der Bestimmung der Größe und der Morphologie von Partikeln im Bereich von ca. 1 – 100 nm im Durchmesser. Zudem wird sie zur Ermittlung des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen der Partikel und zur Molmassenbestimmung von z.B. Proteinen genutzt. Der Vorteil der SAXS gegenüber der Röntgendiffraktometrie liegt darin, dass keine kristalline Struktur benötigt wird. Ausschlaggebender Faktor für die Streuung von Röntgenstrahlung an kolloiden Systemen, wie sie z.B. für NP in ihren Dispersionsmedien auftreten, sind Elektronendichteunterschiede zwischen den Partikeln selbst (wenn es sich um mehrere Spezies handelt) bzw. den Partikeln und dem umgebenden Medium. Die SAXS ermöglicht in diesem Zusammenhang die Beobachtung der Bildung von NP *in-situ*, da die entstehenden Partikel eine wesentlich höhere Elektronendichte als die Stabilisatoren aufweisen. Der schematische Aufbau einer SAXS-Anlage ist in Abbildung 9 dargestellt. Als Röntgenquelle werden für Laborgeräte Röntgenanoden mit diversen Anodenmaterialien (Kupfer, Wolfram, Cobalt etc.) verwendet. Diese senden eine polychromatische Bremsstrahlung aus, in der das für das jeweilige Anodenmaterial charakteristische Spektrum enthalten ist. Diese charakteristischen Wellenlängen müssen dann mittels Kristallen oder Multischichtspiegeln unter Ausnutzung der Bragg-Bedingungen extrahiert werden. Röntgenstrahlung höherer Intensität für z.B. sehr kleine Probenvolumina kann mittels Synchrotronstrahlung genutzt werden, die aber eines Elektronenspeicherringes bedarf. Die von der Röntgenröhre erzeugte polychromatische Strahlung wird zunächst parallelisiert und mittels unterschiedlicher Kollimatoren fokussiert. Zur Parallelisierung des Röntgenstrahls dient z.B. der Göbelspiegel, ein parabolisch geformter Multischichtspiegel, der nach dem Braggschen Gesetz zusätzlich einen monochromatischen Strahl erzeugt. Bei der Kollimation findet z.B. die Kratky-Kamera Anwendung, die aus drei asymmetrisch angeordneten Blenden, in höchstem Maße plan geschliffenen und polierten Metallblöcken, besteht und einen geringen Probe-Detektor Abstand zulässt [58]. Der Röntgenstrahl wird bei der Kratky-Kamera strichförmig kollimiert, was zu einer asymmetrischen Verbreiterung („Verschmierung“) der Streukurven führt. Diese Verschmierung, die einer Aneinanderreihung von Punktfoki entspricht, muss bei der Auswertung der Messdaten mathematisch durch eine Dekonvolution berücksichtigt werden [58]. Der fokussierte, monochromatische Röntgenstrahl trifft schließlich auf die Probe, an der er unter dem Winkel 2θ gestreut wird. Der Hauptteil des Röntgenstrahls tritt ungestreut als Primärstrahl durch die Probe hindurch. Vor dem Detektor wird daher ein „Beamstop“, ebenfalls ein Metallblock, eingesetzt, der nur Streulicht auf den Detektor gelangen lässt. Der Detektor kann z.B. ein Sekundärelektronenvervielfacher oder eine CCD-Kamera sein

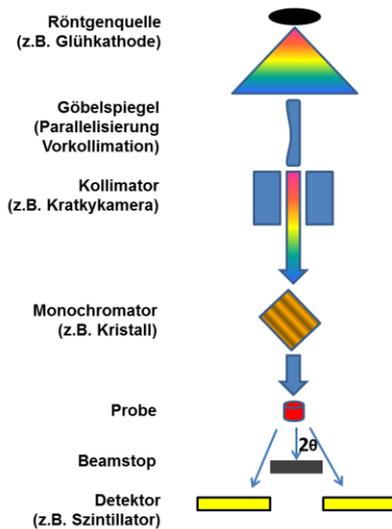


Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer SAXS-Anlage. Die in der Röntgenquelle erzeugte Strahlung enthält mehrere Wellenlängen. Zunächst wird die in einem großen Bereich austretende Strahlung am Göbelspiegel parallelisiert und monochromatisiert, dann am Kollimator fokussiert und anschließend durch einen möglichen weiteren Monochromator auf die Probe gelenkt.

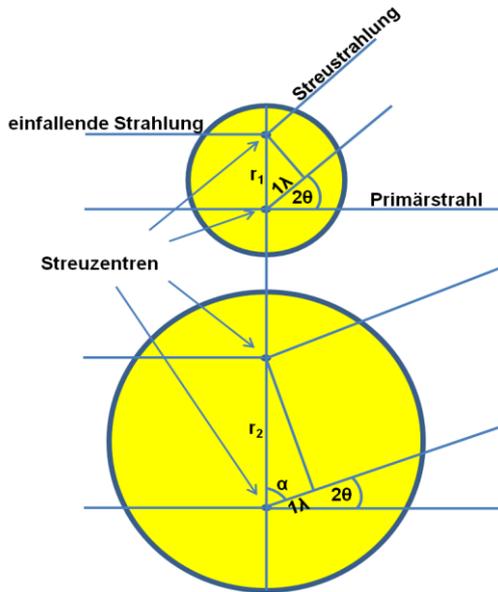
Die Röntgenstrahlung wird an den Elektronen der Atome gestreut und durch den großen Unterschied zwischen Wellenlänge der Strahlung (bei Cu-K_α 1.54 Å) und den Dimensionen der streuenden Körper (im Bereich weniger nm) wird näherungsweise ausschließlich kohärente Streuung nach Thomson und Debye erzeugt (Paper Porod Kolloid 1951). Dabei regen die Röntgenphotonen die Elektronen der Partikel mit der Frequenz der Röntgenstrahlen an (elastische Streuung). Die Elektronen werden dadurch zu Herz'schen Dipolen und emittieren wiederum kohärente Wellen, die dann miteinander konstruktiv oder destruktiv interferieren.

Die streuwinkelabhängige Intensität $I(\theta)$ dieser Photonen ergibt sich nach der Thomson-Gleichung (13) zu:

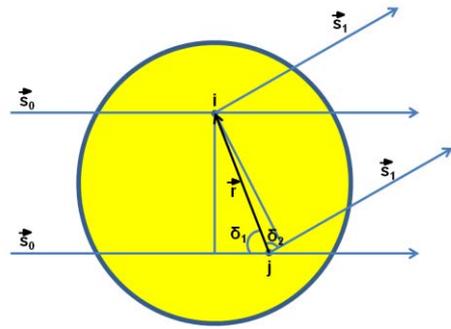
$$I(\theta) = J * 7.9 * 10^{-26} * \frac{1}{R^2} * \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad (13)$$

Hierbei steht J für die Intensität der einfallenden Röntgenstrahlung, $7.9 * 10^{-26}$ ist das Quadrat des klassischen Elektronenradius und R gibt den Abstand zwischen Probe und Detektor an. Dabei ist zu beachten, dass die Streuung teilchengrößenabhängig ist (Abbildung 10 A).

A



B



C

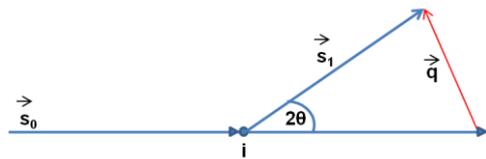


Abbildung 10: (A) Verdeutlichung der Größenabhängigkeit eines Streuexperimentes. Der Phasenunterschied 1λ ist in beiden Fällen gleich groß, aber durch den Unterschied des Abstandes der Streuzentren r_1 und r_2 ändert sich der Winkel α bei größeren Partikeln zu größeren Werten und damit zu einem geringeren Streuwinkel 2θ . (B) Zustandekommen der Phasendifferenz zwischen zwei Streuzentren. Der Primärstrahl wird an den beiden Streuzentren i und j gestreut und die Phasendifferenz berechnet sich zu: $\mathbf{r} \cos \delta_1 + \mathbf{r} \cos \delta_2 = \frac{\lambda}{2\pi} (-\mathbf{s}_0 \mathbf{r} + \mathbf{s}_1 \mathbf{r})$.

Der einfallende Röntgenstrahl \vec{s}_0 wird am Punkt i elastisch unter dem Winkel 2θ in Richtung \vec{s}_1 gestreut. Der Betrag von \vec{s}_0 und beim elastischen Stoß ebenso für \vec{s}_1 ergibt sich zu $\frac{2\pi}{\lambda}$. Daher ergibt sich der Betrag des Streuvektors \vec{q} zu $2|\vec{s}_0| \sin \theta = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$ (Abbildung 10C). Unter Zuhilfenahme der Bragg-Gleichung ($\lambda = 2D \sin \theta$) ergeben sich die kleinsten noch messbaren Streuvektoren demnach zu $D_{max} = \pi/\vec{q}_{min}$, mit \vec{q}_{min} , dem kleinsten noch messbaren Streuvektor [58]. Abhängig von der Elektronendichte (Anzahl der Elektronen pro Volumeneinheit ($\rho(r)dV$)) lässt sich die Streuamplitude aller Elektronen $F(\vec{q})$ in einem Teilchen als Fouriertransformation beschreiben:

$$F(\vec{q}) = \iiint \rho(r) e^{-i\mathbf{r} \cdot \vec{q}} dV \quad (14)$$

Die Intensität der Streustrahlung $I(\vec{q})$ lässt sich aus der Amplitude durch Multiplikation mit der konjugiert komplexen Funktion der Streuamplitude $F^*(\vec{q})$ ermitteln.

$$I(\vec{q}) = FF^* = \iiint \iiint \rho(r_1) \rho(r_2) e^{-i\mathbf{h}(r_1 - r_2)} dV_1 dV_2 \quad (15)$$

Zur Lösung dieses Fourierintegrals werden zwei Schritte benötigt. Der erste Schritt ist das Faltungsquadrat über alle Streupunktpaare gleichen Abstandes ($r = (r_1 - r_2) = konst.$), welche zur Pattersonfunktion führt.

$$\bar{\rho}^2(r) = \iiint \rho(r_1)\rho(r_2)dV_1 \quad (16)$$

In diesem Schritt wird jedem Abstand r ein Punkt in einem imaginären Raum zugewiesen. $\rho^2(r)$ bezeichnet dann die Dichte dieser Punkte im C-Raum. Der zweite Schritt der Berechnung von Gleichung 16 ist die Fouriertransformation des C-Raumes, welche dessen Intensitätsverteilung ergibt:

$$I(\vec{q}) = \iiint \bar{\rho}^2(r) e^{-ihr} dV \quad (17)$$

Damit ist die Intensitätsverteilung der Streuung im inversen Raum von der Form des streuenden Objektes über $\rho^2(r)$ abhängig, welches wiederum durch eine inverse Fouriertransformation der Intensität berechnet werden kann.

$$\bar{\rho}^2(r) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \iiint I(q) e^{ihr} dq_x dq_y dq_z \quad (18)$$

Aus den vorherigen beiden Gleichungen ist eine reziproke Beziehung zwischen Imaginär- und Realraum ersichtlich, je größer r , und damit auch der Partikeldurchmesser wird, desto kleiner müssen auch die Streuvektoren werden, um die gleiche Intensität zu ergeben. Nach diesen eher allgemeinen Regeln für die Streuung von Röntgenphotonen an Partikeln, werden nun die Bedingungen bei Streuung unter kleinen Winkeln beschrieben.

Dazu werden folgende Näherungen vorgenommen:

1. Es liegt ein isotrop streuendes System vor.
2. Das System ist genügend verdünnt, so dass keine interpartikulären Wechselwirkungen auftreten.

Durch die erste Annahme ist $\rho^2(r)$ nur noch von der Größe r abhängig. Dadurch ist der Phasenvektor der Mittelwert über alle Richtungen von r und ergibt sich durch die Debye-Formel zu:

$$e^{ihr} = \frac{\sin(qr)}{qr} \quad (19)$$

Dadurch ergibt sich durch Einsetzen in Gleichung 18 der Ausdruck für $I(\vec{q})$ zu:

$$I(\vec{q}) = \int 4\pi r^2 \bar{\rho}^2(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (20)$$

Aus Forderung 2 geht hervor, dass bei einem genügend großen Abstand r zwischen zwei Streuzentren die Elektronendichteverteilungen unabhängig voneinander sind und laut Gleichung 20 zu einem Mittelwert für das gesamte Volumen tendieren. Damit wäre die Autokorrelationsfunktion nicht mehr strukturabhängig, und daher wird dieser so genannte „Hintergrund“ um die Elektronendichtefluktuation $\eta = \rho - \bar{\rho}$ erweitert, und die Autokorrelationsfunktion ergibt sich zu:

$$\bar{\eta}^2 = \rho - \bar{\rho}^2 = \rho^2 - V\bar{\rho}^2 = V\gamma(r) \quad (21)$$

Diese Autokorrelationsfunktion kann als der Mittelwert zweier Elektronendichtefluktuationen im Abstand r betrachtet werden (mit $r = r_1 - r_2 = konst.$). Dabei liegt das Maximum des Erwartungswertes bei $\gamma(0)$, denn dies ist der Fall, wenn beide Elektronendichten an einem Punkt liegen und damit die Phasen beider an diesen „Punkten“ gestreuten Röntgenstrahlen maximal positiv interferieren, es also keine Phasenverschiebung gibt. Bei $\gamma(\infty)$ sind die beiden Elektronendichten unabhängig voneinander und damit läuft auch die Autokorrelation gegen 0.

Gleichung 20 eingesetzt in Gleichung 21 ergibt

$$I(\vec{q}) = V \int 4\pi r^2 \gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (22)$$

Und die Autokorrelationsfunktion ergibt sich dann durch eine inverse Fouriertransformation zu:

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin qr}{qr} dq \quad (23)$$

Aus den bisher erwähnten Zusammenhängen zwischen realem und reziprokem Raum ergibt sich das sogenannte *Magische Quadrat* [59], Abbildung 11.

Streuintensität und Autokorrelationsfunktion sind bei $q = 0$ und $r = 0$ maximal. Für $r = 0$ gilt z.B.:

$$V\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) dq = V\eta^2 \quad (24)$$

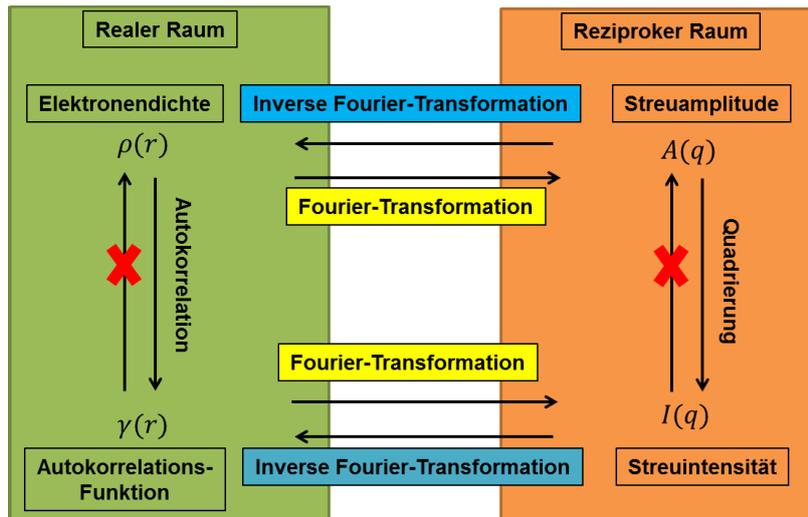


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Magischen Quadrates nach [59]. Aus den Daten im Realraum kann mittels Fourier-Transformation die Streuintensität bzw. Streuamplitude ermittelt werden. Über eine inverse Fourier-Transformation wird dann die Elektronendichteverteilung erhalten.

Hierbei ist zu beachten, dass das Integral in Gleichung 24 nicht mehr von der Form der Partikel abhängig ist, sondern nur noch proportional zum Quadrat der Anzahl der Elektronen der Probe. Das Integral wird daher auch „Invariante“ genannt, die durch Extrapolation von $I(q) \rightarrow 0$ erhalten werden kann. Mittels der Invarianten können Informationen über das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Partikel erhalten werden. Eine typische SAXS-Kurve ist in Abbildung 12 dargestellt.

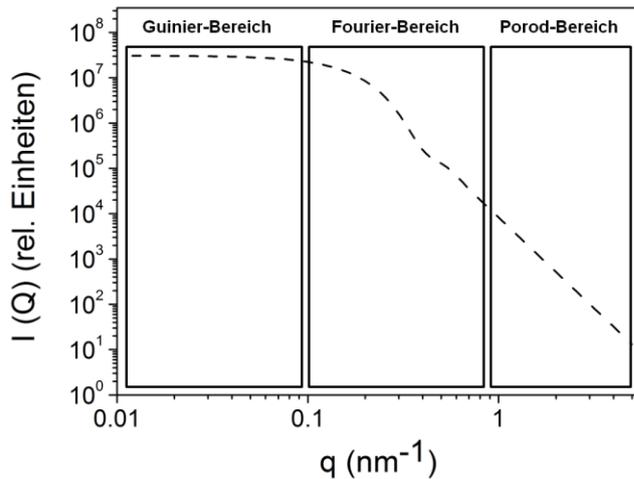


Abbildung 12: Doppeltlogarithmische Auftragung der Simulation einer Streukurve von sphärischen NP mit einem Radius von 10 nm mit einer Schulz-Zimm Größenverteilung und einer Verteilungsbreite von 20 % (gestrichelte Linie). Der Guinierbereich gibt Hinweise auf die Partikelgeometrie, der Porod-Bereich wird z.B. zur Auswertung des Oberfläche/Volumen Verhältnisses der Partikel genutzt. Die Auswertung der Partikelgröße erfolgt aus dem Fourierbereich.

Aus dieser Kurve können durch gewisse Annahmen Informationen über die Partikel gewonnen werden. Die Ausdehnung der Partikel kann über den Gyrationradius (eigentlich Streumassenradius), den mittleren quadratischen Abstand der streuenden Elektronen zum Schwerpunkt des Partikels, erhalten werden. Dazu wird $\ln I(q)$ gegen q^2 aufgetragen und aus der Steigung kann über die Näherung von Guinier direkt der Gyrationradius erhalten werden. Der Abfall der Streukurve im Guinierbereich in Abbildung 12 ist abhängig von der Form des Partikels. Im oben gezeigten Beispiel entspricht der Abfall der Geraden q^{-0} , welcher einem sphärischen Partikel entspricht. Andere Partikelgeometrien weisen abweichende Kurvenformen auf. Im Bereich $\vec{q} \rightarrow \infty$, dem Porod-Bereich, fallen nahezu alle Kurven mit q^{-4} ab, was man sich zum einen mit Hilfe des Porod-Plots zur Berechnung des Untergrundes eines Experimentes zu Nutze machen kann und zum anderen zur Bestimmung des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen. Der Porod-Plot sieht eine Auftragung von $\vec{q}^{-4}(I(\vec{q}))$ gegen \vec{q}^{-4} vor. Bei der entstehenden Gerade gibt die Steigung den noch zu subtrahierenden Hintergrund, resultierend aus Compton-Streuung oder Fluoreszenz an.

3.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische, oder auch quasielastische, Lichtstreuung ermöglicht die zerstörungsfreie Bestimmung hydrodynamischer Eigenschaften von Partikeln in Lösung. Zu diesen Eigenschaften gehören R_H , der translatorische Diffusionskoeffizient sowie auch die Größenvertei-

lung dieser Partikel. Der schematische Aufbau einer DLS-Apparatur ist in Abbildung 13 dargestellt. Diese Messtechnik hat sich für Teilchengrößen von ca. 3 – 3000 nm etabliert. In diesem Fall soll aber nur die Streuung an Teilchen, die etwa in dem Bereich der Rayleigh-Streuung ($d \leq \lambda/20$) liegen, behandelt werden.

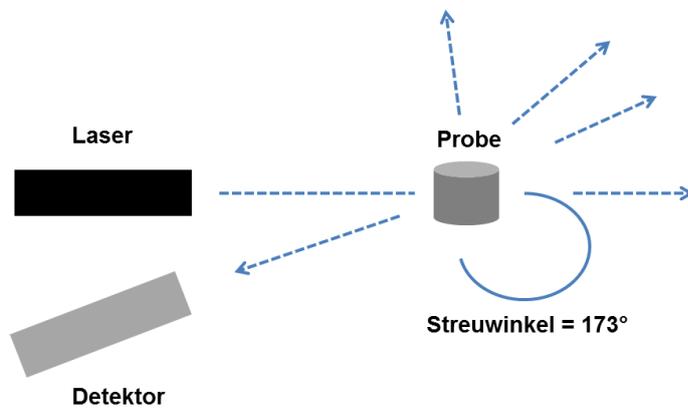


Abbildung 13: Aufbau einer DLS-Apparatur mit Rückstreutechnik. Das Laserlicht wird von der Probe isotrop (richtungsabhängig) gestreut, die Aufzeichnung der gestreuten Intensität findet jedoch nur bei einem Winkel von 173° statt, um Mehrfachstreuung zu umgehen.

Das Laserlicht wird in der Probenküvette, die bei konstanter Temperatur gehalten wird, isotrop gestreut (Rayleigh-Streuung). Dabei ist jeder Partikel Ausgangspunkt einer neuen Kugelwelle. Diese Kugelwellen überlagern sich zu einem Interferenzmuster, welches zeitlich und räumlich fluktuiert. Grund dafür ist die *Brownsche Molekularbewegung*. Ein Photomultiplier oder ähnlicher Detektor nimmt diese Streulichtintensitätsschwankungen auf. Daten bezüglich der Partikeldimensionen werden letztendlich aus den zeitlich fluktuierenden Intensitäten gewonnen. Bei allen Streulichtmessungen ist zu beachten, dass nach Rayleigh die Streulichtintensität proportional zu d^6 (d = Teilchendurchmesser) zunimmt. Zusätzlich ist die Intensität nach Mie proportional zu λ^{-4} (mit λ der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes). Ein typisches Interferenzmuster ist in Abbildung 14 dargestellt. Voraussetzung für die DLS Messungen ist eine möglichst monodisperse und vor allem genügend verdünnte Probe.

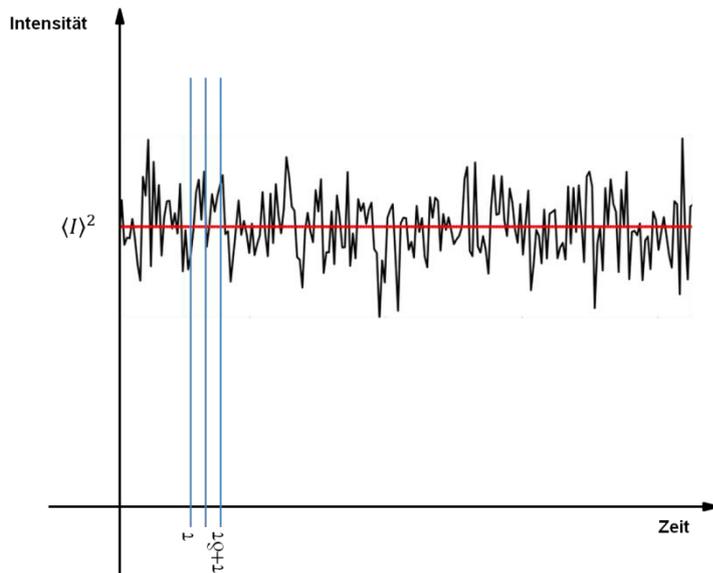


Abbildung 14: Darstellung der Streulichtintensität gegen die Zeit eines typischen DLS Experimentes [60].

Da die Brownsche Molekularbewegung zum Partikelradius über den *Wiener Prozess* reziprok proportional ist, zeigen kleinere Partikel wesentlich schnellere Intensitätsfluktuationen als größere. Das Interferenzmuster wird in viele kleine Zeitintervalle δt (τ) zerlegt, die möglichst schmaler als die Halbwertsbreite der Intensitätspeaks sein sollten. Für die Auswertung dieser Kurven werden die Intensitäten der Interferenzkurve zum Zeitpunkt t mit denen, der jeweiligen Zeitpunkten $t+\tau$ verglichen. Dadurch ergibt sich eine Korrelationsfunktion, die mit fortschreitender Zeit von einem Maximalwert (beim Zeitpunkt t , dem Startpunkt, der mit sich selbst verglichen wird) bis hin zu keiner Korrelation bei sehr hohen $t+\tau$ -Werten (Abbildung 15) reicht. Kleine Partikel, die eine stärkere *Brownsche Molekularbewegung* aufweisen, zeigen schneller Abweichungen von der Anfangsintensität und haben daher eine geringere Korrelation.

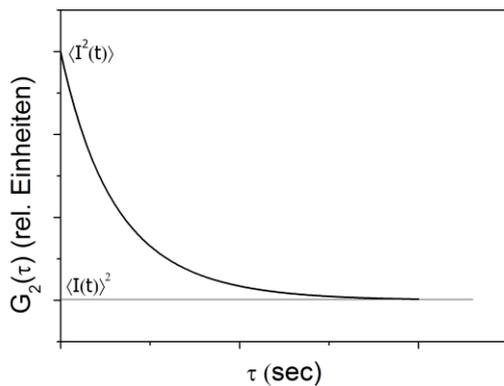


Abbildung 15: Simulation der Intensitäts Autokorrelationsfunktion $G_2(\tau)$. Der Abfall der Kurve verläuft exponentiell. Je kleiner die Partikel, desto schneller tendiert die Kurve gegen $\langle I(t) \rangle^2$. Aufgetragen ist hier $G_2(\tau)$ gegen die Zeitintervalle (τ).

Die Intensitäts Autokorrelationsfunktion $G_2(\tau)$ stellt mathematisch eine Summe von Multiplikationen von Intensitäten I zu einem bestimmten Zeitpunkt t_i mit der Intensität an einem festen, vorherigen Zeitpunkt t_0 dar.

$$G_2(\tau) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I(t_i) I(t_i + t_0) \quad (25)$$

Bei sehr kleinen Zeitunterschieden ist ersichtlich, dass sich für die Korrelationsfunktion $G_2(\tau) = \langle I^2 \rangle$ ergibt, während bei großen Unterschieden $G_2(\tau)$ zu $\langle I \rangle^2$ ergibt. Die normierte Autokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ erhält man aus Gleichung (1.26) durch Division mit $\langle I(t) \rangle^2$.

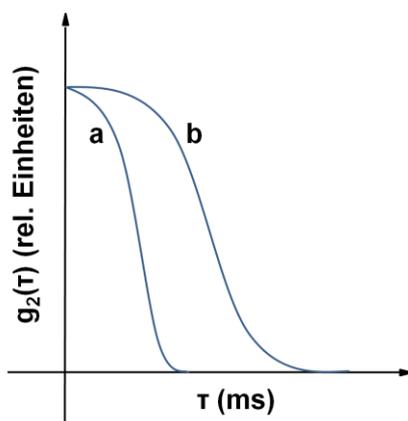


Abbildung 16: Auftragung der normierten Autokorrelationsfunktion gegen die Zeitintervalle τ . Kleinere Partikel (a) weisen eine höhere Brownsche Molekularbewegung auf als größere (b) und weisen daher einen schnelleren Abfall der Korrelationsfunktion auf.

Bei stark verdünnten monodispersen Proben und dem nahezu alleinigen Einfluss der Translation kann $g_2(\tau)$ auch mit einem Exponentialterm beschrieben werden:

$$g_2(\tau) = A + B e^{-2Dq^2\tau} \quad (26)$$

A steht für den Wert der unkorrelierten Signale, der bei sehr großem δt als Basis erhalten wird. I^2 und B stehen für einen Normierungsfaktor. q ist der Streuvektor, der sich mit der Viskosität des Mediums η und dem Streuwinkel θ zu:

$$q = \frac{4\pi\eta}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (27)$$

ergibt. D steht für den translatorischen Diffusionskoeffizienten, der über die Stokes-Einstein-Beziehung auch R_H beinhaltet. Dabei ist zu beachten, dass diese Gleichung streng genommen nur für sphärische Partikel zutrifft. Abweichende Partikelgeometrien ergeben eine Ausschlussvolumenkugel, die sich bei Rotation um die von einer Kugel abweichende Form ergibt.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (28)$$

Die Auswertung der Korrelationsfunktion erfolgt graphisch über eine Auftragung von $\ln G(t)$ gegen die Zeit (Abbildung 17). Dabei ergibt der y-Achsenabschnitt die Variable A und die Steigung B aus Gleichung 27. Bei polydispersen Proben erweitert lässt sich die Korrelationsfunktion nicht mehr nur mit einer Exponentialfunktion darstellen, sondern mit einer durch Y gewichteten (je nach Anteil der jeweiligen Teilchengröße) Summe.

$$g_2(\tau) = \sum_{i=0}^n Y_i e^{-2Dq^2\tau} \quad (29)$$

Die Auswertung dieser Gleichung verläuft dann z.B. mittels einer Kumulantenanalyse, bei der eine Taylorreihenentwicklung durchgeführt wird.

$$\ln(g_2(\tau)) = -K_1\tau + \frac{1}{2!} K_2\tau^2 - \frac{1}{3!} K_3\tau^3 \dots \quad (30)$$

Der erste Kumulant ist dabei proportional zum translatorischen Diffusionskoeffizienten und der zweite Kumulant zum Polydispersitätsindex (PDI) der Probe (Abbildung 17).

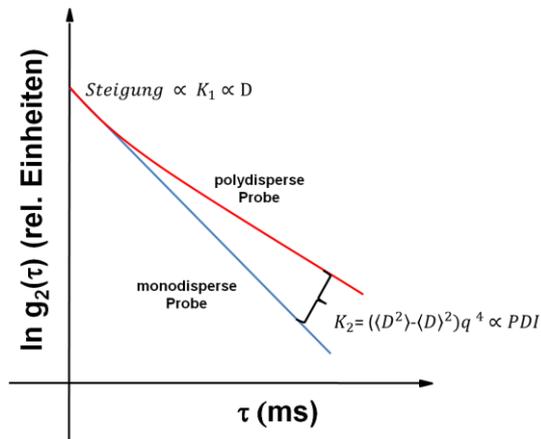


Abbildung 17: Auswertung eines DLS Experimentes zur Bestimmung des PDI über die Auftragung von $\ln G(\tau)$ bzw. $\ln g_2(\tau)$ für polydisperse Proben.

Zusätzlich zu der Auswertung mittels der Kumulantenanalyse können weitere Auswerteverfahren wie die Contin-Analyse oder die Non-Negative-Least-Square (NNLS) Methode angewandt werden [61].

3.3 Massenspektrometrische Untersuchungen

Bei der Identifizierung bzw. Charakterisierung von Proteinen oder auch DNA und RNA nimmt die Massenspektrometrie (MS) und insbesondere die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) eine entscheidende Rolle ein. Aber auch bei der Analytik anderer großer, teilweise fragiler Moleküle wie z.B. Zuckern oder Polymeren wird diese Technik wirkungsvoll eingesetzt. Große, polare Biomoleküle können auf diese Weise ohne nennenswerte Fragmentierung identifiziert werden. Zudem müssen Moleküle bei der MALDI-Technik im Gegensatz zur Ionisation durch Elektronen (Elektronenstoßionisation, EI) oder durch Gase wie Methan (Chemische Ionisierung, CI) nicht mehr flüchtig sein. In der Bioanalytik wird die MALDI-Methode u.a. zur Identifizierung des Proteoms, das Genom eines Lebewesens zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen, eingesetzt.

Der erste Schritt einer massenspektrometrischen Untersuchung ist der Probeneinlass. Die Probe kann hier sowohl fest, als auch flüssig vorliegen. So können z.B. bei der Laserablation feste Proben Schicht für Schicht untersucht werden oder mittels einer HPLC-Trennung flüssige Proben vor Einlass in das Massenspektrometer eine Vortrennung erfahren. Anschließend wird die Probe ionisiert, was unter Ultrahochvakuumbedingungen (10^{-7} bis 10^{-12} mbar) stattfindet. Das Hochvakuum ist nötig, um die Kollision von Analytionen mit Luftmolekülen zu verringern und die mittlere freie Weglänge L der Ionen zu erhöhen.

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2}p\sigma} \quad (31)$$

Die Gleichung beinhaltet die Boltzmannkonstante k , die Temperatur T , sowie den Druck p und den Kollisionsquerschnitt $\sigma = \pi d^2$ eines Moleküls mit dem Durchmesser d . Durch Kollisionen würde entweder eine Ablenkung und anschließende Entladung der Ionen an der Wand des Gerätes oder eine Reaktion mit den Luftmolekülen hervorgerufen werden. Bei der Ionisierung können sowohl positive als auch negative, möglichst einfach geladene, Ionen in der Gasphase erzeugt werden. Diese Ionen werden in einem weiteren Schritt nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) analysiert. Ein Detektor wandelt die zeitlich versetzt eintreffenden Ionen z.B. in Stromsignale um, deren Intensität dann quantitativ ausgewertet werden kann. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers ist in Abbildung 18 dargestellt. Im folgenden Abschnitt wird genauer auf die MALDI-Methode eingegangen werden.

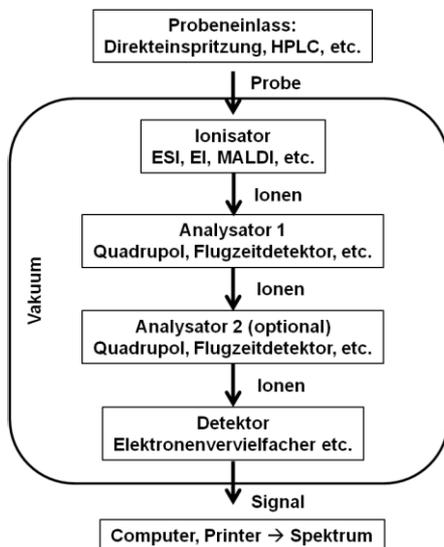


Abbildung 18: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.

3.3.1 MALDI-MS-MS

Prinzipiell eingeführt wurde diese Methode 1988 von Karas und Hillenkamp [62]. Eine MALDI-Analyse erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird der Analyt in einer sogenannten Matrix in Lösung gebracht. Diese Matrix muss eine hohe Absorption der bei der Desorption verwendeten Laserwellenlänge aufweisen. Eine Liste von häufig genutzten Matrizes der verschiedenen Lasertypen ist in Tabelle 2 gezeigt. IR-Laser haben in der Bioanalytik gegenüber UV-Lasern den Vorteil, dass sie Wellenlängen haben, die biologisch relevante Matrizes wie

Wasser anregen können. IR-MALDI erzeugt im Gegenzug jedoch kurzlebige Ionen und weisen eine geringere Sensitivität als die UV-MALDI auf.

Tabelle 2 Gängige Matrizes verschiedener Lasertypen für MALDI.

Lasertyp	Matrizes
UV-Laser (BSP.: N ₂ , ND:YAG)	α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA) 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymethylsäure (Sinapinsäure) (SA)
IR-Laser (BSP.: ER:YAG, CO ₂)	Wasser, Harnstoff Butandisäure (Bernsteinsäure)

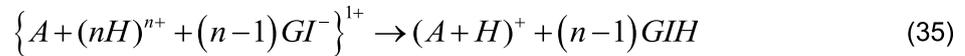
Der Mechanismus der Ionengenerierung bei MALDI ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Das naheliegendste Konzept ist die Multiphotonen-Ionisation. Dabei werden Matrixmoleküle M zunächst in einen angeregten elektronischen Zustand versetzt. Während ihrer kurzen Lebensdauer (wenige Nanosekunden) werden die angeregten Moleküle M^* im ersten Schritt durch weitere Photonenanregung zu Radikalkationen $M^{\bullet+}$ und Elektronen. Der zweite Schritt muss über eine Mehrfachanregung verlaufen, da berechnete Ionisierungspotentiale von Matrixmolekülen häufig über der zweifachen Photonenenergie der jeweiligen Laser liegen. Dieser Mechanismus kann auch ohne angeregtes Zwischenmolekül verlaufen [63].



Eine weitere Theorie zur Matrix-Ionengenerierung beinhaltet die Anregung mehrerer Matrixmoleküle und ihre Reaktionen untereinander, die ebenfalls zu Radikalkationen und Elektronen führen. Diese Radikalkationen führen dann in einem weiteren Schritt mit freien Wasserstoffradikalen zu $(M - H)^+$ welches dann mit Analytmolekülen A zu $M + (A - H)^+$ reagiert [64]

Eine neuere so genannte *lucky survivor*-Theorie von Karas geht im Gegensatz zu der vorherigen Annahme nicht davon aus, dass die Analytmoleküle bei der Inkorporation in die Matrix ihre Ladung verlieren [64]. Bei der Desorption entstehen in diesem Fall Cluster, die nur wenige (teilweise einzelne) Analytmoleküle beinhalten und daneben noch Gegenionen, die aus der Matrix generiert werden oder aus dem Solvens stammen. Zusätzlich ist ein Überschuss neutraler Matrixmoleküle vorhanden. Diese Cluster haben dann aufgrund statistischer Verteilung

lung der Gegenionen teilweise eine negative Ladung. Im Hochvakuum kommt es in diesen Clustern zu einem Übertrag von Ladungsträgern, im Falle von Proteinen meist H^+ , der Analytmoleküle zu den negativen Gegenionen. Dabei werden alle positiven Ladungen des Analytmoleküls bis auf eine neutralisiert [64].



Die erzeugten Ionen werden anschließend mittels einer Spannung (mehrere 10 kV), die im Hochvakuumbereich zwischen Analytträger, z.B. einer Stahlplatte, die kleine (mehrere 100 μm \varnothing) Vertiefungen enthält, und Analysator angelegt wird, beschleunigt (Abbildung 19).

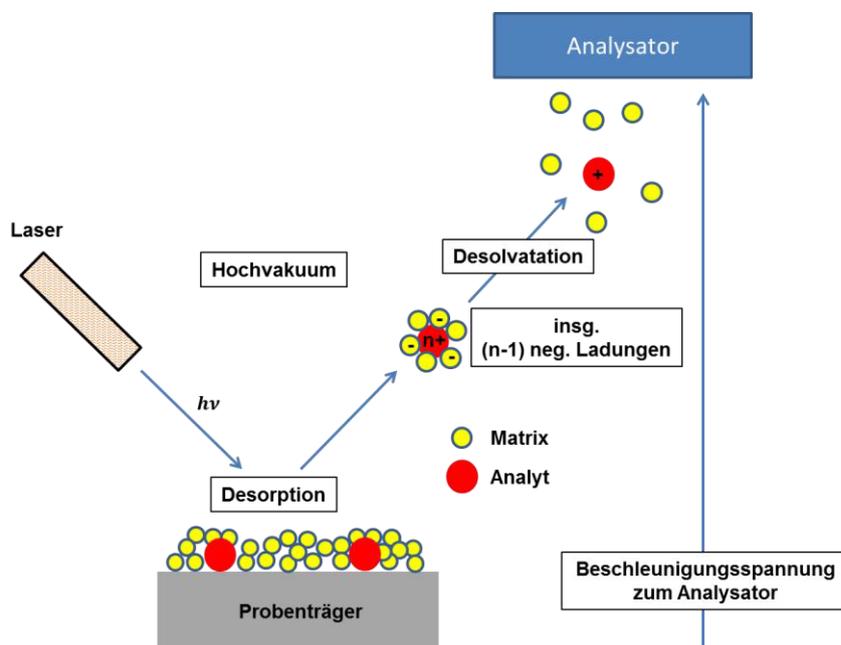


Abbildung 19: Prinzip der Analyt-Ionenenerzeugung mit MALDI. Ein Laserstrahl trifft auf die in einer Matrix eingebettete Probensubstanz. Die Matrix absorbiert den Hauptteil der Laserenergie und wird zusammen mit dem Analyten desorbiert. Hierbei geben die Analytmoleküle einzelne Elektronen an die Matrixmoleküle ab. Durch eine angelegte Spannung gelangen die Analyt/Matrix-Cluster zum Analysator, wobei auf dem Weg im Hochvakuum Matrixbestandteile verdampfen bzw. im Analysator nicht ausgewertet werden.

Analysatoren bei MALDI-Quellen sind meistens Flugzeitanalysatoren (ToF), die zusätzlich mit einem Reflektor ausgestattet sein können. Andere Analysatoren sind z.B. Fourier Transformation Ionen-Cyclotron Resonanz Analysatoren (ICR), oder Quadrupole. In ToF-Analysatoren werden die Ionen durch eine angelegte Spannung zunächst in Richtung Detektor beschleunigt. Die Detektion erfolgt dann abhängig von den aus der Beschleunigung resultierenden Ionengeschwindigkeiten nach Durchfliegen einer feldfreien Strecke. Bei der Be-

beschleunigung erhalten alle Ionen die gleiche kinetische Energie, durch ihre unterschiedliche Masse unterscheiden sich die Ionen jedoch in ihren Geschwindigkeiten.

In der Beschleunigungsphase wird elektrische Energie E_{el} in kinetische Energie E_{kin} umgewandelt:

$$E_{el} = zeV_s = qV_s = \frac{1}{2}mv^2 = E_{kin} \quad (36)$$

Hierbei steht z für die Ladung der Ionen, e für die Elementarladung, V_s für die angelegte Spannung und m für die Masse der Ionen. Die Geschwindigkeit v der Ionen ist dann folgendermaßen gegeben:

$$v = \sqrt{\frac{2zeV_s}{m}} \quad (37)$$

Die Auflösung eines ToF-Ansalytors ergibt sich aus der Beziehung m/z . Diese ergibt sich aus der vorherigen Gleichung und Substitution von $v = \frac{L}{t}$, mit der Wegstrecke der Ionen im feldfreien Raum L , zu:

$$\left(\frac{m}{z}\right)^{\frac{1}{2}} = \left(\frac{\sqrt{2eV_s}}{L}\right)t \quad (38)$$

Betrachtet man dieses Verhältnis nun über einen bestimmten Zeitraum und über viele Massen, so ergibt sich über die jeweiligen Ableitungen (dm, dt):

$$\frac{1}{z}dm = \left(\frac{2eV_s}{L^2}\right)t^2 dt \quad (39)$$

und durch Auflösen beider Gleichungen nach $\frac{2eV_s}{L^2}$:

$$\frac{m}{dm} = \frac{t}{2dt} \quad (40)$$

Die Auflösung R beträgt demnach:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \approx \frac{L}{2\Delta x} \quad (41)$$

Δx steht hier für die Breite einer auf dem Detektor ankommenden Ionenwolke. Δm ist die kleinste noch zu trennende Massendifferenz. Zwei benachbarte ($\Delta m = 1$) Massenpeaks sind dann als getrennt anzusehen, wenn die Peaks bei halber Peakhöhe nicht mehr als 50% überlappen. Die Auflösung von herkömmlichen ToF-Analysatoren beträgt etwa 1000, was für die Bestimmung von teilweise sehr engen Proteinmassenverteilungen eigentlich zu gering wäre. Daher gibt es bestimmte Möglichkeiten zur Verbesserung der Auflösung: Zum einen über die Methode der *Delayed Pulse Extraction* und zum anderen über Reflektrons. Im normalen kontinuierlichen Modus der Ionenextraktion, werden die Ionen erzeugt, und dann sofort beschleunigt. Dies kann dazu führen, dass Analytmoleküle mit gleichem m/z Verhältnis, die auf dem Probensträger an der Oberfläche liegen, eine geringere kinetische Energie besitzen als Partikel, die tiefer liegen, was insgesamt eine Peakverbreiterung bedeutet. Im Falle der *Delayed Pulse Extraction* wird die Matrix zunächst genauso angeregt, die herausgeschlagenen Cluster können anschließend jedoch kurzzeitig (einige 100 ns) relaxieren und erst dann erfolgt die Beschleunigung zum Detektor. Dabei verweilen die Partikel mit anfangs geringerer kinetischer Energie länger in der Spannungszone und erfahren damit einen größeren Energiezuwachs. Dadurch gleichen sich die kinetischen Energien wieder aneinander an und die Partikel gelangen ohne große Verzögerung zum Detektor. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Auflösung der ToF-Analysatoren ist das so genannte Reflektron. Dabei handelt es sich um eine Reihe von Metallplatten, an die eine Spannung angelegt wird, und die dann ein elektrostatisches Feld generieren. In dieses Feld, dessen Ladung den Ionen entgegengesetzt ist, geraten dann Ionen verschiedener kinetischer Energien aber gleichen m/z Verhältnisses. Ionen mit höherer kinetischer Energie penetrieren das Feld tiefer als solche mit geringerer Energie. An einem bestimmten Punkt im Reflektron werden die Ionen vom entgegengesetzt geladenen Feld vollkommen gebremst und anschließend mit betragsgleichen kinetischen Energien wie vor Eintritt ins Reflektron in die Gegenrichtung auf einen Detektor gelenkt (Abbildung 20). Die Ionen, die zuvor eine höhere kinetische Energie hatten, haben ihren Vorsprung gegenüber den übrigen Ionen durch den längeren Weg im Reflektron verloren und gelangen nun zeitgleich zum Detektor.

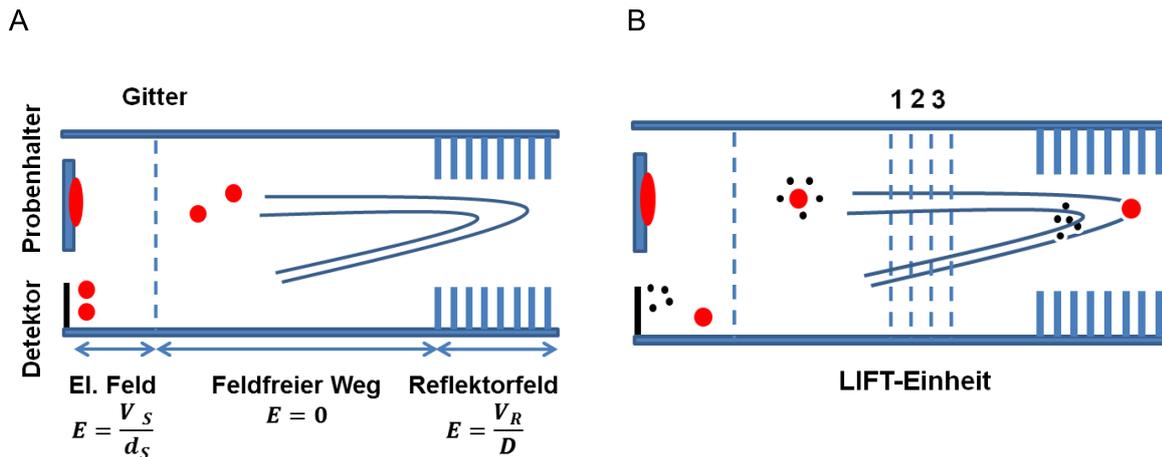


Abbildung 20: A) Schematischer Aufbau eines ToF-Analysators mit Reflektor. Die Ionen mit gleichem m/z Verhältnis aber unterschiedlichen kinetischen Energien, werden im Reflektorfeld durch ein entgegengesetztes elektrisches Feld gebremst und anschließend vereint auf den Detektor beschleunigt. B) Durch In source Decay (ISD) generierte Ionen werden mittels dreier Spannungsfelder (1,2,3) im feldfreien Raum nach ihren kinetischen Energien getrennt und anschließend mittels eines Reflektors zum Detektor geleitet.

Ein weiterer Analysatortyp ist der Quadrupol. Hierbei handelt es sich um vier parallel liegende Stabelektroden, deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden. Durch jeweils gegenüberliegende Elektroden werden zwei Gleichspannungsfelder, denen zusätzlich eine Wechsellspannung überlagert wird, rechtwinklig zueinander erzeugt. Die Ionen werden durch die Gleichspannung durch den Quadrupol geleitet und die Wechsellspannung sorgt dafür, dass Ionen entsprechend ihres m/z Verhältnisses durch das sinusförmige Feld von dem geraden Weg abgelenkt werden und unerwünschte Massen durch zu starke Auslenkungen an den Stabelektroden entladen werden.

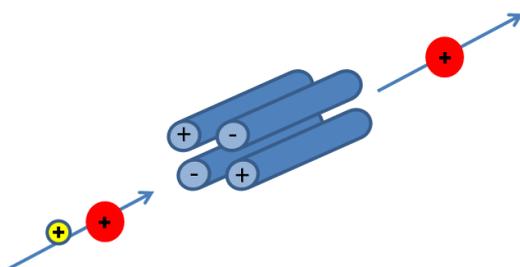


Abbildung 21: Schematische Darstellung eines Quadrupols, in das zwei Ionen gleicher Ladung aber unterschiedlicher Masse fliegen. Dabei erfolgt eine Ablenkung und letztendlich Entladung an den Elektroden des leichteren Moleküls durch die sinusförmige Spannung im Quadrupol.

Analysatoren lassen sich miteinander kombinieren. Man spricht in diesem Fall auch von Tandem-Massenspektrometrie. Angewendet wird diese Analysatoranordnung z.B., wenn die Komponenten einer Probe nicht bekannt sind. In diesem Fall werden zwar Ionen mit einer bestimmten Masse detektiert, aber möglicherweise handelt es sich um einen Stoff, der zwar

die gleiche Masse wie der gesuchte hat, jedoch eine andere chemische Zusammensetzung. In diesem Fall macht man sich das Phänomen des ISD zu Nutze. Beim ISD handelt es sich um den Zerfall von angeregten Analytmolekülen (in der Literatur häufig als Precursor-Ionen bezeichnet) während ihrer Flugzeit in der Ionenquelle, wobei eine möglichst geringe Spannung angelegt werden muss, um diese Flugzeit zu erhöhen. Dabei besitzen die Fragmente, die für jeden Analyten charakteristisch sind, die gleiche Geschwindigkeit. Bei kürzeren Verweilzeiten in der Ionenquelle kann es nachträglich, also auf dem Weg im feldfreien Raum, zum Zerfall der Ionen kommen („Post Source Decay“, PSD). Eine Möglichkeit der Trennung der Fragmente nach PSD besteht mit dem Reflektor. Kleinere Fragmente werden aufgrund ihrer geringeren Masse (bzw. Energie) den Reflektor früher wieder verlassen, als größere. Somit werden sie auf dem Detektor auch zeitlich versetzt aufgezeichnet.

Die kinetischen Energien der Precursor E_{kp} bzw. Fragmente E_{kf} ergeben sich folgendermaßen aus der Geschwindigkeit v_{ix} bis zum Reflektor:

$$E_{kp} = \frac{m_p v_{ix}^2}{2} \quad E_{kf} = \frac{m_f v_{ix}^2}{2} \quad (42)$$

$$\frac{E_{kp}}{E_{kf}} = \frac{m_p}{m_f} \equiv E_{kf} = \frac{E_{kp} m_f}{m_p} \quad (43)$$

Die Eindringtiefe d in den Reflektor ist gegeben durch: $d = E_k/qE$ (q = Ladung der Ionen, E = Stärke des elektrischen Feldes im Reflektor). Daraus ergibt sich für die jeweiligen Eindringtiefen:

$$d_p = \frac{E_{kp}}{qE} \quad d_f = \frac{E_{kf}}{qE} = \frac{\frac{E_{kp} m_f}{m_p}}{qE} \quad (44)$$

Daraus folgt für d_f :

$$d_f = d_p \frac{m_f}{m_p} \quad (45)$$

Mit $d_f \propto t_{rf}$ (der im Reflektor verbrachten Zeit der Fragmente bzw. auch Precursor) folgt:

$$t_{rf} = \frac{t_{rp} m_f}{m_p} \quad (46)$$

Eine Möglichkeit der Filterung der Fragment- und Precursor-Ionen nach ISD ist der LIFT-Modus, der auch in dem in dieser Arbeit beschriebenen MALDI verwendet wurde. Beim LIFT-Modus werden die durch ISD entstandenen Fragmente und Precursor (eine „Ionenfamilie“) auf dem Weg zum ToF-Analysator durch drei Spannungsfelder geleitet [65]. Bis zu diesen Spannungsfeldern besaßen die Ionen noch gleiche Geschwindigkeiten, aber unterschiedliche kinetische Energien. Ein Precursor-Ion mit $\frac{m}{z} = 1000$ hat eine 10 mal höhere kinetische Energie als ein Fragment-Ion mit $\frac{m}{z} = 100$. Dann erfolgt eine Beschleunigung durch die angelegte Spannung, die allen Ionen zwar einen gleichen Energiegewinn bereitet, aber nachträglich zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die anfänglichen Energieunterschiede (Abbildung 20 B) führen. Als Detektoren werden Sekundärelektronenvervielfacher, photographische Platten oder Faraday-Detektoren (Ionen erzeugen durch Entladung einen Strom, der detektiert wird) genutzt.

3.4 Zellkultur

Um die proteomische Antwort des Dünndarms auf die Exposition mit Ag NP zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die humane intestinale Zelllinie Caco-2 verwendet. Sie wurde aus dem humanen Kolonadenokarzinom eines kaukasischen Erwachsenen kultiviert. Auch ohne den Einfluss äußerer Faktoren, wie z.B. Dimethylsulfoxid, können diese Zellen unter Zellkulturbedingungen differenzieren und entwickeln dabei morphologische und biochemische Charakteristika von Dünndarmenterocyten, welche für die Resorption von Stoffen zuständig sind. Bei Caco-2 Zellen setzt Konfluenz, also der Zeitpunkt, an dem die Zell-Zell Kontakte eine weitere Zellteilung behindern, nach ca. sechs Tagen ein. Die Polarisierung der Zellen, also die Differenzierung des apikalen und des basalen Zellpols, setzt sich in der stationären Phase (ab Tag neun), in der ein Gleichgewicht zwischen absterbenden und nachwachsenden Zellen vorliegt, weiter fort [66]. Es werden *tight-junctions* ausgebildet, die der Kommunikation zwischen Epithelzellen dienen und den Fluss von Molekülen über das Epithel regeln. Zudem ist die Zelloberfläche nach der Konfluenz mit Mikrovilli (Zotten) belegt, die eine sogenannte „brush-border“ ausbilden. An dieser findet im Darm die Absorption von Molekülen aus dem Darmlumen statt; ebenso ist diese Schicht für den Kohlenhydratabbau zuständig, welchen sie über Ausschüttung von Enzymen aus ihrer apikalen Plasmamembran bewerkstelligt. Typische brush-border Enzyme sind alkalische Phosphatase, Sukrase-Isomaltase und Aminopeptidase [67]. Die vollständige Differenzierung der Zellen ist etwa nach drei Wochen abgeschlossen.

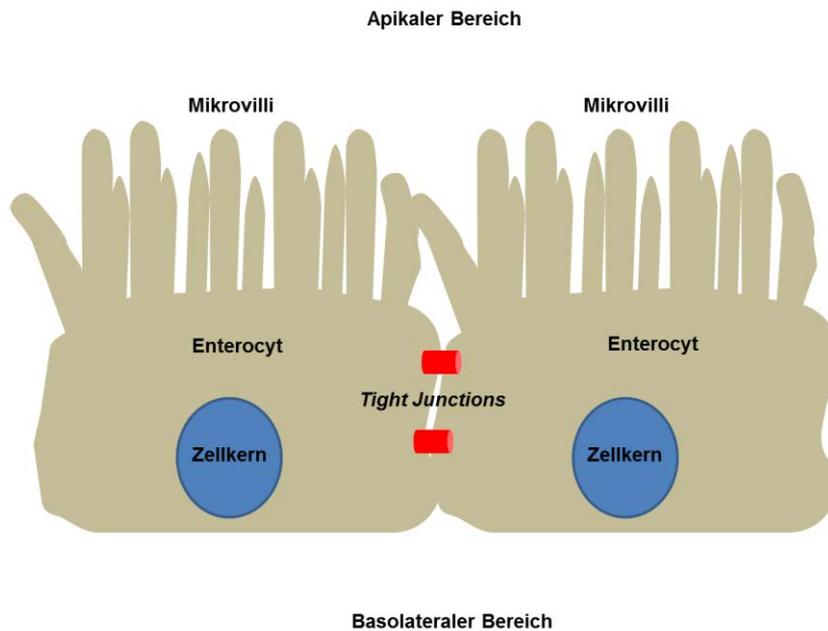


Abbildung 22: Schematischer Aufbau eines ausdifferenzierten Caco-2 Monolayers.

Auch auf proteomischer Ebene findet eine Entwicklung der Zellen während der Differenzierung statt. Die Caco-2 Zellen besitzen nach der Differenzierung nicht mehr alle Merkmale einer Tumorzelle. So sind z.B. Proteine, die RNA-Prozessierung und die Zellzyklusprogression betreffen, herunterreguliert. Proteine, die für die Aufnahme von Xenobiotika oder Pharmazeutika zuständig sind, werden im Gegensatz dazu hochreguliert [68]. Dies erklärt die gute Verwendbarkeit dieses Zelltyps als *in-vitro* Modell für Versuchsreihen bezüglich der intestinalen Aufnahme. Dennoch fehlen diesen Zellen die natürlichen Merkmale eines Dünndarmepithels wie z.B. dem *Mucus*, also die Schleimschicht, die die Zellen sowohl vor dem Eigenverdau schützt, als auch wichtige Verdauungsenzyme beinhaltet. Ebenso fehlen dem Caco-Modell M-Zellen, die Teil der *Peyer-Drüsen* sind und deren immunologische Funktion unterstützen bzw. ergänzen. Dennoch wird das Caco-2 Zellsystem für Aufnahmestudien gerne genutzt, da die Zellen relativ leicht zu kultivieren sind und eine ausreichende Übereinstimmung mit dem Dünndarmepithel gegeben ist [67, 69].

4 Material und Methoden

4.1 Wasser

Das bei allen Experimenten eingesetzte Wasser entsprach den Anforderungen eines Typ I Wassers ($R > 18 \text{ M}\Omega$ bei 25°C ; $\text{TOC} < 10 \text{ ppb}$) nach ISO 3696 und wurde mit einer MilliQ-Advantage A10 Anlage (Millipore, Billerica, USA) gewonnen.

4.2 Nanopartikel und Silbernitrat

Bei den eingesetzten NP handelte es sich um Ag-NP der Firma Rent a Scientist® (Regensburg, Deutschland) mit dem Markennamen AgPure™ sowie Partikel der Firma Nanocomposix (San Diego, USA) mit dem Markennamen Biopure Silver.

Die Partikel *AgPure* sind mit Tween20 und Polyoxyethylen (25)-glycerin-trioleat (Tagat® TO V) beschichtet; die Konzentration dieser beiden Stabilisatoren in der Stammdispersion beträgt laut Hersteller jeweils 4% (v/v) (entsprechend $2.2 \times 10^{-2} \text{ M}$ Tagat TO V und $3,61 \times 10^{-2} \text{ M}$ Tween20). Die Silberkonzentration der Stammdispersion beträgt laut Hersteller 10% (w/v) (entsprechend 0.93 M) und wurde mit Wasser zu einer Arbeitsdispersion mit einem Silbergehalt von 0,1% (w/v) verdünnt. Die Partikel *Biopure Silver* sind mit Polyvinylpyrrolidon (PVP, Molekulargewicht: $10.000 \text{ g Mol}^{-1}$) stabilisiert und die Silberkonzentration der Stammdispersion beträgt laut Hersteller 0,1% (w/v). Die Konzentration des Stabilisators wurde vom Hersteller nicht angegeben. Diese Stammdispersion wurde, soweit nicht im experimentellen Teil anders erwähnt, unverdünnt für die weiteren Experimente verwendet. Beide Partikel besitzen eine sphärische Form mit einem Partikelkerndurchmesser von $13.0 \pm 0.3 \text{ nm}$ (AgPure) und $19.3 \pm 0.3 \text{ nm}$ (Biopure).

Silbernitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde mit einer Konzentration von 0.1 mol L^{-1} erworben.

4.3 Asymmetrischer Fluss Feld-Flussfraktionierung Experimente

Die A4F-Analytik wurde an einer Apparatur der Firma Postnova Analytics (Landsberg am Lech, Deutschland) durchgeführt. Das A4F-System besteht aus einem AF2000 Fokus-System, welches mit einem automatischen Probennehmer PN 5200 ausgestattet ist. Zusätzlich enthält das System den Online-Entgaser PN7505 sowie die Fokus- und Injektions-/ Träger-Pumpen PN 1122. Beide Pumpen waren mit einem Solvensfilter (100 nm, Material: regenerierte Cellulose) ausgerüstet. Der A4F-Trennkanal hatte bei allen Experimenten eine

Höhe von 500 μm . Die Trennkanalmembran bestand aus Polyethersulfon (PES) mit einem Molekulargewichtsgrößenausschluss (MWCO) von 3.500 g mol^{-1} . Als Solvens wurde Wasser mit einem Zusatz von 0.1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) und 0.02 % Natriumazid (beide Produkte von Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Flussgeschwindigkeiten wurden mittels der Software AF2000 (Postnova, Landsberg am Lech, Deutschland) geregelt. Eine so genannte *Slot-Outlet* Funktion wurde am Ende des Trennkanals genutzt, um das Volumen des Trägerflusses einzuengen und die Konzentration der Analyten zu erhöhen [56]. Dabei wird kurz vor Ende des eigentlichen Kanalausganges eine weitere Kapillare als Auslass an den Kanaldeckel angeschlossen, die Teile des Trägerflusses ableitet und dafür den Rückdruck des Solvens am Kanalende nutzt. Am Ende des Trennkanals erfolgt eine Überleitung des Analyten mittels Kapillaren in einen UV-Detektor (Milton-Roy, Pont Saint-Pierre, Frankreich) geleitet und dort die Absorption bei Wellenlängen von 280 nm und 430 nm detektiert. Anschließend wurden die Proben mittels eines programmierbaren Probensammlers (Gilson, Middleton, USA) als zeitliche Fraktionen der Trennung wurden in Polyethylenterephthalat (PET) -Gefäßen (Carl Roth, Berlin, Deutschland) aufgenommen. Alle A4F-Experimente wurden bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug, soweit nicht anders beschrieben, jeweils 100 μL . Die Injektion erfolgte durch eine Mikroliterspritze (Carl Roth, Berlin, Deutschland). Die Konzentration des Analyten betrug bei den Injektionen, soweit nicht anders beschrieben, jeweils $500 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$. Die Injektionszeit betrug 6 min bei einem Injektionsfluss von 0.1 mL min^{-1} und einem Querfluss von 1.5 mL min^{-1} , der dann binnen 40 min bei linearer Flussratenreduzierung auf 0 mL min^{-1} verringert wurde. Die Fraktionssammlung wurde, eine Minute nachdem der Hauptpeak der Silberpartikel im UV-Detektor sichtbar war, aufgrund des Versatzes zum Probensammler gestartet. Die gesamte Prozedur wurde zweimal wiederholt, um ausreichend Probenmaterial für die weiteren Untersuchungen zu erhalten.

4.4 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Sofort nach der A4F-Fraktionierung wurden die gewonnenen Proben ohne weitere Aufarbeitung mit der dynamischen Lichtstreuung untersucht. Die Analysen wurden mit einem Zetasiizer Nano (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem He-Ne Laser (Wellenlänge $\lambda = 632.8 \text{ nm}$) ausgerüstet und wurde im Rückstreumodus (Streulichtwinkel $2\theta = 173^\circ$, entsprechend einem Streuvektor $q = \frac{4\pi\eta \sin \theta}{\lambda} = 0,02$ bei 25°C) betrieben. Es wurden zudem AgPure Partikel bei 37°C mit einer Silberkonzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1 % Insulin, Transferrin und Selen (ITS) dispergiert und in 10 minütigen Abständen mit DLS untersucht.

Das Zetapotential der Partikel wurde ebenfalls mit dem Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) untersucht, der die Laser-Doppler-Anemometrie zur Auswertung nutzte. Dafür wurden von beiden Partikeln Dispersionen mit einem Gesamtsilbergehalt von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Wasser angesetzt und nach kurzer Ruhezeit analysiert.

4.5 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die aus der A4F gewonnenen Dispersionen konnten für die SAXS Messungen nicht verwendet werden, da die Konzentrationen nicht ausreichend waren. Von den Partikeln AgPure und Biopure wurden stattdessen Dispersionen in Wasser sowie ZKM (Ag Konzentration: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) hergestellt und diese dann nach 24 h bei 37°C im Trockenschrank ohne weitere Aufarbeitung analysiert. SAXS Messungen wurden mit einer SAXSess-Anlage (Anton Paar, Graz, Österreich), die eine Kratky-Kamera beinhaltet, durchgeführt. Die Proben wurden in einer Quarz-Kapillare untersucht. Der Abstand zum Detektor betrug 0.309 m. Der Streuvektor ist definiert als $q = \frac{4\pi\eta \sin \theta}{\lambda}$ bei $\lambda = 0.154 \text{ nm}$. Die erhaltenen SAXS-Kurven wurden mittels SAXSquant™ Software (Version 3.5, Anton Paar, Graz, Österreich) bearbeitet. Zunächst wurde die Intensität der Hintergrundstreuung der einzelnen Solvenzien (Wasser, DMEM + 10 % fötalen Kälberserums (ZKM) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)) der NP bestimmt. Diese wurde dann von den korrespondierenden Intensitäten der Analytmessungen abgezogen. Um die Verschmierung des Röntgenstrahlprofils durch den Kollimator zu berücksichtigen, wurde eine Dekonvolution der SAXS-Kurven mittels indirekter Fourier Transformation unter Zuhilfenahme der Software PCG (Universität Graz, Version 2.02.05) durchgeführt. Die erhaltenen Datensätze wurden mittels der Software SASfit an das bestmögliche Streukurvenmodell angepasst, und aus diesem die Partikelgröße sowie der PDI ermittelt [70].

4.6 Dialyse

Es wurden Dialysen beider NP über 24 h und 168 h durchgeführt. Jeweils 3 ml einer Dispersion (Ag Konz.: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) der einzelnen NP in i) Wasser, ii) ZKM und iii) NaCl (6.4 g L^{-1}) (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde für den jeweiligen Zeitraum bei 37°C gegen 300 mL Wasser im Dunkeln unter konstantem Schütteln dialysiert. Die Dialysemembran (Spectra/Por™, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) bestand aus Zelluloseester mit einem Molekulargewichtsgößenausschluss von $500\text{-}1000 \text{ g Mol}^{-1}$.

Für die zeitaufgelöste Dialyse über eine Woche wurde eine AgPure-Dispersion in ZKM mit insgesamt $75 \mu\text{g Ag}$ hergestellt. Dabei wurde zunächst eine Dispersion in Wasser mit der

genannten Konzentration hergestellt, diese dann bei 4000×g für 30 Minuten zentrifugiert (Heraeus 3SR+, Thermo Fisher, Waltham, USA). Der Überstand wurde verworfen und das NP-Pellet mit ZKM aufgenommen und in die Dialysemembran aus Zelluloseester (Spectra/Por™, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) überführt. Die Dialysen wurden bei 37°C gegen 300 mL Wasser im Dunkeln und unter konstantem Schütteln ausgeführt. Nach 10, 20, 40, 60, 120, 240, 300, 360, 1440 und 10080 Minuten wurden jeweils 2 mL des Dialysats entnommen und mittels ICP-MS analysiert.

4.7 Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie

Nach Ablauf der Dialyse wurde die Membran aus dem Dialysegefäß entfernt und dem Dialysat 50 mL HNO₃ (Ultrapure, 70%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Die Lösung wurde daraufhin 10 min gerührt. 5 mL dieser Lösung wurden zur Analytik mittels ICP-MS an die Firma Eurofins (Hamburg, Deutschland) versandt.

Die Proben aus der zeitaufgelösten Dialyse wurden mit 2 mL halbkonzentrierter HNO₃ (Ultrapure, 70%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) behandelt, 5 Minuten gerührt und dann mittels ICP-MS (X-series II, Thermo, Waltham, USA) direkt gemessen.

4.8 Zentrifugation

Es wurden AgPure Dispersionen in ZKM sowie in ITS mit einer Silberkonzentration von jeweils 25 und 500 µg mL⁻¹ hergestellt, die dann 24 h bei 37°C im Trockenschrank (Heraeus Function-Line, Thermo-Fisher, Waltham, USA) gelagert wurden. Anschließend wurden die Proben dreimal je 20 Minuten bei 2000×g zentrifugiert (Heraeus 3SR+, Thermo Fisher, Waltham, USA). Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und der Bodensatz mit jeweils einem mL PBS resuspendiert. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt, 30 µL SDS-Probenpuffer (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) hinzugegeben, die erhaltene Dispersion 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt und abschließend für 5 Min bei 95°C erwärmt. Die erhaltene Dispersion wurde dann ohne weitere Aufarbeitung für die eindimensionale Gelelektrophorese(1-DE)-Experimente genutzt.

4.9 Transmissionselektronenmikroskopie-Bilder

Ein Tropfen der jeweiligen A4F-Fractionen wurde ohne weitere Aufbereitung staubfrei auf einem kohlenstoff-beschichteten Kupfernetz getrocknet. Anschließend wurden TEM-Bilder sowie EDX-Spektren mittels eines JEM 2200FS (Jeol, Akishima-Shi, Japan) aufgenommen.

4.10 Zellkultur, Proteinextraktion und Expositionsversuche

Humane kolorektale Adenokarzinomzellen (Caco-2, Passage 23) wurden von der Europäischen Zellkultur-Sammlung (ECACC, Salisbury, GB) erworben. DMEM und FKS wurden von PAA (Paa Labs, Pasching, Österreich) bezogen. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), inklusive 10% FKS, 0.5% Penizillin und 0.5% Streptomycin, in 250 mL Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellinkubator (Hereaus Function Line, Thermo Fisher, Waltham, USA) kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit 0.1% Trypsin und 0.04% EDTA passagiert, sobald eine Zellzahl von ca. 1×10^5 erreicht war. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie für die Dauer von 21 Tagen ausdifferenziert. Nachdem die Zellen ausdifferenziert waren, wurde das überstehende Medium verworfen. Vor den Expositionsversuchen wurde ZKM mit Ag-NP Arbeitsdispersionen sowie SN versetzt, so dass neue Dispersionen mit Silberkonzentrationen von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (AP25), $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (AP2.5) für die NP und $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SN5) sowie $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SN0.5) für das SN entstanden. Jeweils drei Flaschen wurden mit 20 mL AP25, AP2.5, SN5 und SN0.5 versetzt. Drei weitere Flaschen wurden allein mit 20 mL ZKM versetzt (Kontrollgruppe). Die Gesamtheit der Flaschen wurde als „Biologische Replikat“ bezeichnet. Die Flaschen wurden anschließend für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator belassen. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS (Sigma Aldrich, München, Deutschland) gewaschen. Die Zellen wurden mit 1.2 mL Lysispuffer von den Flaschenböden gelöst. (Zusammensetzung Lysispuffer: Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland) 420 g L^{-1} , Thioharnstoff (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) 152 g L^{-1} , Serdolit® (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) 1.6 g L^{-1} , CHAPS (BioRAD, München, Deutschland) 40 g L^{-1} , Pharmalyte (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) 20 mL L^{-1} , Destreak Reagents (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) 12 mL L^{-1} , Spermin (Sigma Aldrich, München, Deutschland) 7 g L^{-1} , Protease Inhibitoren (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) Im Anschluss wurden die Flaschen für 30 Minuten geschüttelt und die Zelldispersion bei $40.000 \times g$ für 1 h zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und das Zelllysate bei -78°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.11 1-dimensionale Gelelektrophorese

Zunächst wurden Ag-NP-Dispersionen sowohl von AgPure als auch Biopure mit einer Silberkonzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in ZKM 24 h bei 37°C im Dunkeln gelagert. Fraktionen aus der A4F-Trennung dieser Dispersionen wurden dreimal je 15 min bei $2.500 \times g$ zentrifugiert. Nach der ersten und zweiten Zentrifugation wurde der Überstand jeweils entfernt und durch PBS (Merck, Darmstadt, Deutschland) ersetzt. Nach der dritten Zentrifugation wurde zu-

nächst der Überstand entfernt und 40 µL reduzierender Probenpuffer (Sigma Aldrich, München, Deutschland) hinzugefügt. Die resultierende Dispersion wurde 5 min bei 95°C erhitzt, dann 5-10 min abgekühlt und anschließend auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel (Acrylamid und SDS von Serva, Heidelberg, Deutschland) aufgetragen. Auch die Proben, die bei den Zentrifugationsexperimenten erhalten wurden, wurden auf diese Weise behandelt. Nach einer 1.5 h Elektrophorese (15 W pro Gel, bei 400 V) in einem Mini-Protean Tetra System (BioRAD, München, Deutschland) wurden die erhaltenen Gele dreimal für je drei Minuten mit Wasser gewaschen. Die weitere Aufbereitung erfolgte in Übereinstimmung mit dem Protokoll für 2-D-Gele. Entstandene Proteinbanden wurden mit einer UV-Lampe (D0-C01, Biometra, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht und mittels eines Skalpells ausgeschnitten. Die Aufbereitung der Gelbanden für die MALDI-Analytik erfolgte entsprechend des Protokolls für die 2-D-Gele.

4.12 2-dimensionale Gelelektrophorese

Die Zelllysate wurden nach Oberemm *et al.* [71] für die Gelelektrophorese vorbereitet. Von jedem der biologischen Replikate wurden vier technische Replikate hergestellt, welche insgesamt 60 Proteinlösungen ergaben. Mit jeder dieser Lösungen wurde eine Isoelektrische Fokussierung (IEF) mit Immobiline DryStrip Gels (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) mit einem pH-Gradienten von 3-10 in einer IPGPhor Elektrophoreseeinheit (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Zeitlicher Ablauf der Trennung: 15 h bei 30 V, danach 1.5 h bei 200 V, am nächsten Tag 1 h bei 500 V, in weiteren 13.5 h linear ansteigend bis 1000 V, dann in 3 h linear ansteigend bis 8000 V und abschließend 6 h bei 8000 V bei 50 µA pro Gelstreifen. Für jeden Gelstreifen wurden etwa 150 µg Protein appliziert. Nach der Fokussierung wurden die Gelstreifen auf 12.5% SDS-Polyacrylamidgele transferiert und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels eines Ettan DALT® II Elektrophoresesystems (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) getrennt. Zeitlicher Ablauf der Trennung: 30 min bei 3 W / Gel, danach ca. 5.5 h bei 15 W / Gel. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese zunächst über Nacht in einer Lösung aus 30% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), 10% Essigsäure (100%ig) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 60% Wasser auf den Gelen fixiert. Nachdem die Gele dreimal je 30 min in Wasser gewaschen wurden, erfolgte die Färbung mit Tris-(bipyridin) Ruthenium(II)-chlorid [72] über sechs Stunden. Anschließend wurden die Gele zweimal für 10 min mit Wasser gewaschen, dann 15 h lang in einer Lösung aus 40% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), 10% Essigsäure (100%, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 50% Wasser entfärbt, sowie abschließend zweimal für je 10 min in Wasser gewaschen. Nach der Reinigung wurden die Gele in dem Spotpicker ProXPRESS (Perkin Elmer, Waltham, USA) fotografiert. Die Gele wurden mittels der Biostatistiksoftware DELTA-

2D (Version 4.0, Decodon, Greifswald, Deutschland) sowie ProteinMine (Version 1.5.2 Scimagix/Biolmagene, San Mateo/ San Jose, USA) ausgewertet. Zur Auswertung wurden die Intensitäten der Spots der Mediumkontrollen mit denen der Behandlungsgruppen durch einen zweiseitigen Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test verglichen ($p < 0.05$). Nur Spots, die in zwei der drei biologischen Replikate bzw. zwei der vier technischen Replikate präsent waren, wurden für die Auswertung verwendet. Zudem wurden nur Spots ausgewählt, die einen *fold-change* (FC) von weniger als -1.4 bzw. mehr als +1.4 aufwiesen. Der fold-change gibt den Unterschied der Expression eines Proteins in den behandelten Zellen im Vergleich zu seiner Expression in einer unbehandelten Kontrollgruppe wider. Die Unterschiede der Spotintensitäten wurden durch den Vergleich der Mediane der Spotintensitäten in der Mediumkontrolle mit denen der jeweiligen Behandlungsgruppen ausgewertet.

4.13 Proteinidentifikation mittels MALDI-MS-MS

Die aus der 2-DE erhaltenen Gelstücke wurden für das MALDI folgendermaßen präpariert: Waschen mit Wasser für 5 min, Behandlung mit einer Lösung aus 50 % Acetonitril (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 50 % 50 mM NaHCO₃ (Sigma Aldrich, München, Deutschland) für 15 min, Behandlung mit Acetonitril für 15 min. Die Proben in 0.5 mL Eppendorfgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)) wurden während jedes Behandlungsschrittes geschüttelt und nach der Behandlung wurde jeweils der Überstand verworfen. Nach dem letzten Behandlungsschritt mit Acetonitril wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 35°C ca. 15 min getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden anschließend in i) 10 mM NaHCO₃ für 10 min, ii) einer Lösung aus 50% Acetonitril und 50 % 10 mM NaHCO₃ für 15 min iii) 10 mM NaHCO₃ für 5 min, iv) einer Lösung aus 50% Acetonitril und 50 % 10 mM NaHCO₃ für 5 min und v) reinem Acetonitril für 15 min resuspendiert. Wiederum wurden die Proben während jeder Behandlungsphase geschüttelt und nach jeder Phase der Überstand entnommen und verworfen. Nach der letzten Behandlung mit Acetonitril wurden die Gelstücke erneut für 15 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die trockenen Gelstücke wurden 30 min in einem Eisbad mit 5 µL einer Trypsinlösung (Roche, Basel, Schweiz) mit 10 ng Trypsin mL⁻¹ zur Reaktion gebracht. Daraufhin wurde der Überstand entfernt und 3 µL 50 mM NaHCO₃ hinzugefügt. Die Eppendorfgefäße wurden verschlossen und bei 37°C über Nacht in einem Trockenschrank (Thermo Fisher, Waltham, USA) aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde die Reaktion durch Zugabe einer Lösung aus 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 30 % Acetonitril gestoppt. Anschließend wurden die Gelstücke 10 min in einem Sonorex RK1000 Ultraschallbad (Bandelin, Berlin, Deutschland) behandelt, der Überstand entnommen und in neue Eppendorfgefäße überführt. Dieser Vorgang wurde anschließend wiederholt und die Überstände

vereinigt. Ein μL der erhaltenen Lösungen wurde anschließend auf einem Anchor-Chip Target (Bruker, Berlin, Deutschland) mit $800\ \mu\text{m}$ Probenplatzdurchmesser aufgetragen. Nachdem die Lösung getrocknet war, wurde $1\ \mu\text{L}$ einer Matrixlösung (bestehend aus 85 % Acetonitril, 15 % Wasser, 0,1 % TFA, $1\ \text{mM}\ \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Merck, Darmstadt, Deutschland) und $0.7\ \text{mg}\ \alpha\text{-Cyano 4 Hydroxyessigsäure}$ (HCCA, Sigma Aldrich, München, Deutschland)) hinzugefügt. Die getrockneten Proben wurden anschließend in das Ultraflex II ToF/ToF (Bruker, Bremen, Deutschland) überführt und die Listen deregulierter Proteine qualitativ mittels der implementierten Software Biotoools (Version 3.2) sowie Mascot (Matrix Science, Großbritannien) ausgewertet. Die Proteine wurden dabei mit einem MOWSE-(Molecular Weight Search) Score bewertet, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass die identifizierte Peptidsequenz zufällig zustande gekommen sein kann. Der Mowse-Score errechnet sich nach der Formel:

$$-10\log P = \text{Mowse Score} \quad (47)$$

Wobei P für die absolute Wahrscheinlichkeit steht. Eine Wahrscheinlichkeit von 10^{-20} würde dadurch zu einem Mowse-Score von 200. Nur Proteine, die einen Mowse-Score von mindestens 69 aufwiesen und deren Spezies „bovin“ war, wurden ausgesucht. Anschließend wurden die Molgewichte und Isoelektrischen Punkte der vorhergesagten Proteine mit den Positionen auf dem Gel verglichen. Dieser Vergleich ergab die letztlich in dieser Arbeit erhaltenen Proteine.

4.14 Proteomik

Die Listen der deregulierten Proteine wurden mit der Software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems, Redwood City, USA) hinsichtlich ihrer biologischen Zusammenhänge ausgewertet. Die Dateneingabe wich nicht von den Standardvorgaben des Programms ab, außer dass die zur Auswertung involvierten Spezies auf „Human“ beschränkt wurden. Ausgehend von den für die jeweiligen Behandlungsgruppen spezifischen Proteinlisten (im Programm als *focus genes* bezeichnet) generierte IPA-Proteinnetzwerke, die sowohl aus den experimentell bestimmten deregulierten, als auch von IPA empfohlenen Proteinen bestanden. Diese Netzwerke beinhalten Proteine, deren Funktionen in dem zuvor ausgewählten Organismus (in diesem Fall einer menschlichen Zelllinie) entweder direkt oder indirekt miteinander verknüpft sind. Die Verknüpfungen der von IPA eingefügten theoretischen Proteine mit den experimentell nachgewiesenen erfolgt über einen von IPA entwickelten Algorithmus [73]. Die Netzwerküte (*Score*), also die Wahrscheinlichkeit, genau diesen Satz an *focus genes* im Netzwerk durch Zufall aus dem Datensatz aller bei IPA gelisteten Proteine zu erhalten, generiert sich aus einem Chi-Quadrat-Test. Je höher der *Score*, desto geringer die

Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ereignisses. Für alle Behandlungsgruppen wurde eine IPA-Vorhersage der *upstream* bzw. *downstream* Effekte, bzw. der Aktivierung von Signaltransduktionswegen durchgeführt. Dabei wurden die focus genes mit den in den Signaltransduktionswegen enthaltenen Proteinen abgeglichen. Je höher die Übereinstimmung, desto höher der errechnete *p-value*, die mittels Chi-Quadrat-Test ermittelte Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung zu diesem Signaltransduktionsweg zufällig war. Die Signaltransduktionswege sowie die Namen markanter Proteine sind in dieser Arbeit kursiv dargestellt, da sie nicht aus dem Englischen übersetzt wurden. Zusätzlich wurden *Upstream Transkriptions Regulatoren* (UR) ermittelt. Diese wurden mittels einer Abwandlung des Student t-Tests mit einem z-score bewertet, der angibt, wie gut die vorhandene Deregulation des experimentellen Gendatensatzes mit dem aus einer Datenbank übereinstimmt, die alle Gene enthält, die bei dem gesuchten UR dereguliert sein können. Als signifikant wurden URs mit z-scores ≥ 2 oder ≤ -2 bewertet.

5 Resultate und Diskussion

5.1 Analytik

NP sind in biologischen Experimenten, wie z.B. *in-vitro* Tests, Matrices ausgesetzt, die die ursprünglichen Partikeleigenschaften deutlich verändern können. In dieser Arbeit wurde als Testsystem die permanente humane Adenokarzinomzelllinie Caco-2 genutzt, die nach dreiwöchiger Ausdifferenzierung die Merkmale eines Dünndarmepithels aufweist. Die Zellen werden durch ein Zellkulturmedium, einer Lösung aus Salzen, Vitaminen, Proteinen, Aminosäuren sowie Zucker, ernährt. Dieses Medium ist der erste Faktor, der die physikalisch-chemischen NP-Eigenschaften nachhaltig verändern kann. Durch die erhöhte Salzkonzentration kann die elektrochemische Doppelschicht $1/\kappa$ der NP nach

$$\kappa = \left(\frac{4\pi N z_i^2 e}{\varepsilon k T} \right)^{1/2} \quad (48)$$

(N = Zahl der Ladungsträger pro Volumeneinheit, z_i = Ladungszahl, e = Elementarladung, ε = Dielektrizitätskonstante der Doppelschicht) verringert werden. Dadurch ändern sich interpartikuläre Wechselwirkungen und Oberflächenladungen der Partikel. Das Medium enthält zudem 10 % v/v fetales Kälberserum, welches eine, von Charge zu Charge unterschiedliche, Proteinlösung darstellt. Diese Proteine können in Form einer Proteinkorona die Oberfläche der NP stark beeinflussen und damit ihr Verhalten gegenüber den untersuchten Zellen. Um mögliche toxische Auswirkungen der Partikel auf das Testsystem zu verifizieren bzw. bestimmte Partikeleigenschaften diskutieren zu können, mussten die Partikel sowohl vor Exposition auf das Testsystem als auch währenddessen hinreichend analysiert werden. Die hier untersuchten NP sind im ersten Fall mit nicht-ionischen Tensiden (Tween20, Tagat TO V) sowie im zweiten mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) stabilisiert (siehe Abbildung 23). Da Oberflächenladung und Proteinadsorption sowie Toxikodynamik von NP häufig miteinander verknüpft sind, wurde zunächst das Zetapotential der Partikel bestimmt [46].

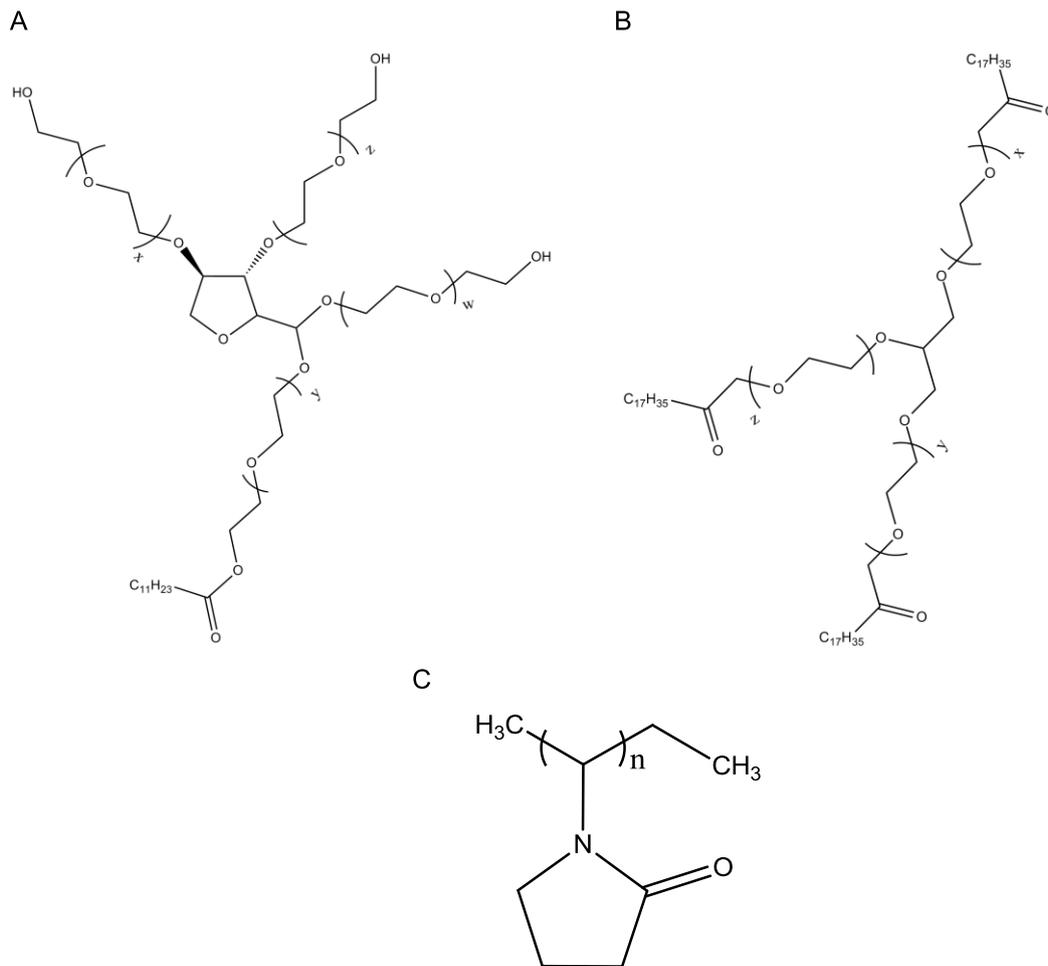


Abbildung 23 Stabilisatoren der einzelnen NP. AgPure ist mit Tween20 (A) und Tagat TO V (B) stabilisiert, während die Nanocomposix Partikel mit PVP (C) stabilisiert sind. Die Summe aus x, y, z und w bei Tween20 ergibt 16, bei Tagat TO V ergibt die Summe von x, y und z 25.

Das Zetapotential von AgPure, welches mit nichtionischen Stabilisatoren belegt ist, betrug in Wasser -19 ± 5 mV, und auch die Nanocomposix Partikel wiesen, trotz eines nicht-ionischen Stabilisators (PVP), ein deutlich negatives Zetapotential von -23 ± 5 mV auf (Abbildung 24).

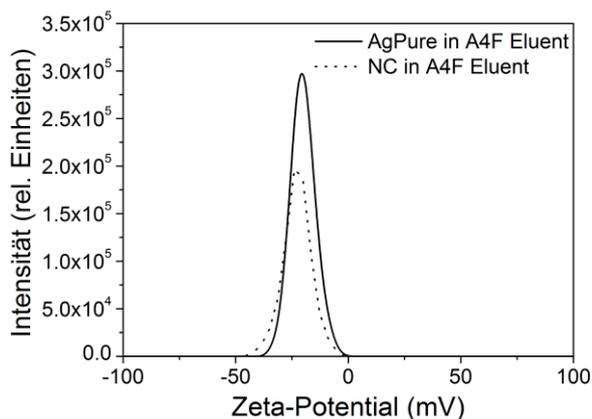


Abbildung 24: Zeta Potential von AgPure (durchgezogene Linie) und Nanocomposix (gestrichelte Linie) bei einer Silberkonzentration von jeweils $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Der pH-Wert der Dispersionen betrug 6.8 für AgPure und 6.9 für Nanocomposix.

Die Ergebnisse der Zetapotential-Messungen in Wasser stimmten im Fall von Nanocomposix gut mit den Herstellerangaben überein (-23 mV gemessen zu -25 mV laut Hersteller). Herstellerangaben zu diesem Charakteristikum gab es von AgPure nicht. Generell wird Silber als Elektronenakzeptor eher negativ geladene Moleküle in seiner elektrochemischen Doppelschicht akkumulieren. Demzufolge entstanden die negativen Zetapotential bei AgPure durch die Akkumulation von elektronenreichem Sauerstoff aus den Carbonylgruppen und dem Sorbitolring von Tween20 als Verbindungsatome zur Partikeloberfläche ausgebildet [74]. Bei den Nanocomposix Partikeln erklärte sich die negative Ladung durch die Bindung von elektronenreichem Stickstoff des Lactam-Ringes an die Partikeloberfläche [75]. Zusätzliche negative Ladungen wurden vermutlich durch die Hydroxylgruppen der Stabilisatoren und Anlagerung von Hydroxylionen aus dem Wasser verursacht.

5.1.1 UV-Vis

Die Partikeldetektion in der A4F erfolgte mittels UV-Detektoren. Daher wurden zunächst die UV-Absorptionsspektren der Partikel in verschiedenen Medien vor den A4F Trennungen aufgenommen. Dispersionen der NP vor den UV-Vis Experimenten wurden, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, vor Beginn der A4F-Experimente angesetzt. Die zugehörigen wellenlängenabhängigen Extinktionen sind in Abbildung 25 zu sehen. Bei beiden NP (Abbildung 25 A und B) war eine leichte Rotverschiebung des Spektrums nach Dispersion in ZKM zu beobachten. Die Maxima der Hauptpeaks der A4F Eluentendispersion lagen für AgPure bei 417 nm und für Nanocomposix bei 406 nm. Nach 24 h Lagerung in ZKM verschob sich dieses Maximum zu 420 nm bei AgPure und 409 nm bei Nanocomposix. Beide Peaks wiesen im A4F Eluenten eine nahezu identische Halbwertsbreite von 75 nm (AgPure) und 72 nm (Nanocomposix) auf. Der Kurvenverlauf beider Partikel in A4F Eluentendispersion

nach 0 und 24 Stunden war nahezu identisch, was auf die Stabilität der Partikel in Bezug auf Aggregationen hinwies. Die Kurven der A4F Eluentendispersionen zeigten ein erstes Maximum bei 220-240 nm. In diesem Bereich liegt die Absorption von Silberionen [76]. Die AgPure-Partikel zeigten in diesem Bereich in der A4F Eluentendispersion ein ausgeprägteres Maximum als die Nanocomposix Partikel. Dieses Maximum verschwand nach Zugabe des ZKM bei beiden Partikeln nahezu vollständig. Die Bande zwischen 250 und 285 nm war auf die Absorptionsbanden der Aminosäuren Tryptophan (284 nm), Tyrosin (274 nm) und Phenylalanin (254 nm) zurückzuführen [77]. Der Peak bei ca. 250 nm, der ebenfalls bei beiden Partikeln auftrat, ließ sich durch die Bildung von AgCl , AgCl_2^- bzw. AgCl_4^{3-} erklären, die nach Zugabe des chloridionenhaltigen ZKM entstehen [78]. Sowohl bei AgPure als auch bei den Nanocomposix Partikeln erschien bei ca. 550 nm nach 24 h eine weitere Bande nach der Zugabe von ZKM. Bei dieser Wellenlänge absorbiert Cytochrom C, dessen Absorption anfangs durch Adsorption an das Silber minimiert wurde, nach einiger Zeit aber durch mögliche Konformationsänderungen bzw. Austausch der Proteinkoronomoleküle wieder aktiviert wurde [79-83]. Abbildung 25 C zeigt das UV-Spektrum von ZKM nach 0 und 24 h bei 37 °C. Die Bande bei ca. 275 nm wurde durch die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin hervorgerufen, die Bande bei 550 nm durch Cytochrom C.

Metall-NP zeigen eine hohe Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Aktivität. Zudem weisen beide Partikel Stabilisatoren auf, die einen „charge-transfer“ Komplex mit dem Silberkern eingehen können, um eine SPR-Wirkung noch zu verstärken. Auch eine Adsorption von Proteinen kann zu einer Verstärkung der Absorption im UV-Vis Bereich führen [84]. Die vor den A4F-Messungen vorgenommenen UV-Vis Analysen ergaben eine bathochrome Verschiebung der Maxima der Peaks, die durch die NP hervorgerufen werden, von 3 nm bei beiden NP. Diese Verschiebung war ein erstes Indiz für eine Vergrößerung des Partikeldurchmessers nach Zugabe des ZKM und damit bedingter Aggregation oder Ausbildung einer Proteinkorona [80, 85]. Die Halbwertsbreiten der Hauptpeaks vergrößerten sich nach Dispersion in ZKM bei beiden Partikeln, was auf eine höhere Polydispersität der Proben hindeutet [80]. Es kam bei beiden Partikeln zur Bildung von partiell löslichen Silberchloriden (AgCl , AgCl_2^- , AgCl_4^{3-}) nach Zugabe von ZKM, wobei der Peak für Silberionen bei 220-240 nm zugunsten des neuen Peaks für die AgCl -Spezies bei 250 nm verschwand [86, 87]. Die Verbreiterung der Hauptpeaks der NP erfolgte auch durch den Übergang in die bei 550 nm erscheinende Absorption von Cytochrom C.

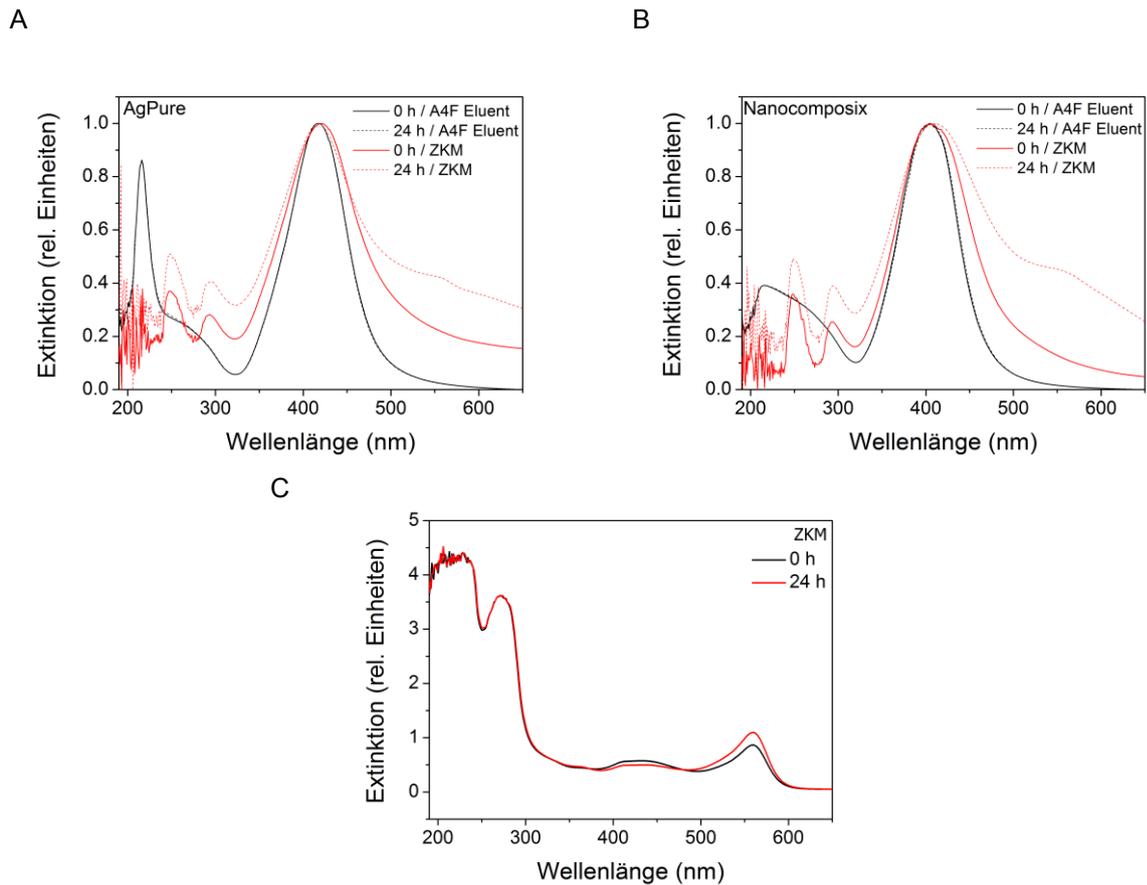


Abbildung 25: Normierte UV-Vis Spektren von (A) AgPure-NP und (B) Nanocomposix-NP nach 0 h bei 37°C in Wasser und ZKM (jeweils schwarze durchgezogene bzw. gestrichelte Linie) und 24 h bei 37°C in Wasser und ZKM (jeweils rote durchgezogene bzw. gestrichelte Linie). Alle untersuchten Dispersionen hatten eine Silberkonzentration von 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (C) UV-Vis Spektrum von ZKM ohne NP nach 0 (schwarze Linie) bzw. 24 h (rote Linie) bei 37°C.

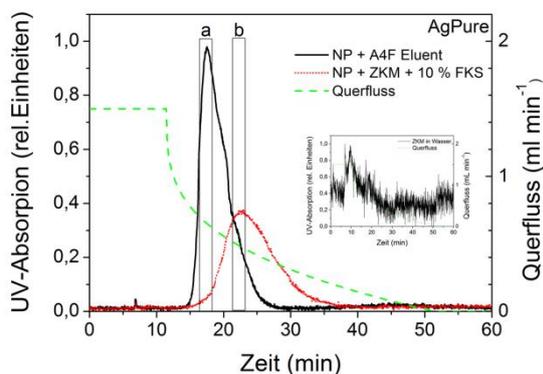
Abschließend kann zu den UV-Vis Messungen gesagt werden, dass es zu einem Wachstum der Partikel durch das ZKM gekommen ist, freie Silberionen zu Silberchloridspezies umgewandelt wurden und die Polydispersität der Dispersionen anstieg.

5.1.2 Asymmetrischer Fluss Feld-Flussfraktionierung

Da nach der Partikelsynthese eine Größenverteilung der NP zu erwarten ist, müssen die Partikelensembles mittels der A4F aufgetrennt werden. Bei der Analytik mit Lichtstreuexperimenten kann es ansonsten zu einer Überbewertung der größeren Partikel kommen, da die Streuintensität mit dem Partikelradius zur sechsten Potenz zunimmt. Zusätzlich entfernt bzw. verdünnt diese Separationsmethode überschüssiges Stabilisatormaterial, welches durch die Partikelsynthese anfällt. Stabilisatoren könnten Agglomerate bilden, die einen größeren hydrodynamischen Durchmesser besitzen als die NP und damit bei Lichtstreuexperimenten aufgrund der stärkeren Streuung großer Partikel (vgl. Kapitel 3.2.2) das Ergebnis verfälschen. Als Laufmittel wurde Wasser gewählt. Da es aufgrund der starken Verdünnung in der A4F

möglicherweise zu einer Verarmungsflockung der Partikel kommen könnte, wurde, um dies zu verhindern, dem Laufmittel 0,1 % (w/v) SDS (0.0007 M) zugesetzt. Die kritische Mizellkonzentration von SDS (0.0082 M) wurde hierbei deutlich unterschritten. Zusätzlich wurden 0,02 % Natriumazid hinzugefügt, um die Kapillaren der A4F frei von Biofilmen zu halten. Am Ende des Trennkanals wurden die Partikel sowohl durch einen UV- als auch einen RI-Detektor geleitet (zugehörige UV-Absorption der Elutionen in Abbildung 26). Für AgPure wurde die Absorptionswellenlänge von 430 nm und für Nanocomposix von 400 nm gemäß der zuvor durchgeführten UV-Vis Analysen gewählt.

A



B

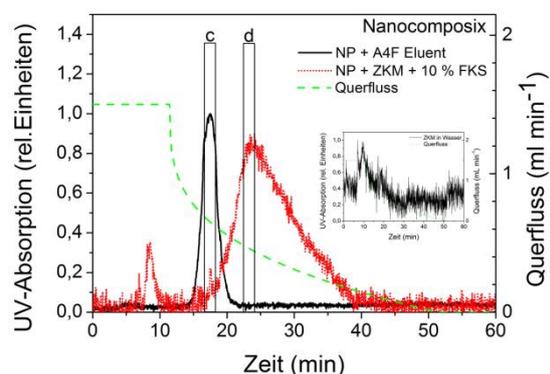


Abbildung 26: UV-Vis Absorption während der A4F Trennung von AgPure bei 430 nm (A) und Nanocomposix bei 400 nm (B) (Ag-Konz. jeweils $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) in Wasser (schwarze Linie) und ZKM (rote Linie) nach 24 h bei 37°C . Bei beiden Partikeln wurde das gleiche Querflussprofil gewählt (grüne gestrichelte Linie). Die Buchstaben a, b, c und d in den Elugrammen kennzeichnen die Minutenbereiche der automatisierten Probenentnahme für die DLS Messungen. Die Insets beider Elugramme enthalten die A4F Elution von ZKM mit der gleichen Proteinkonzentration wie in den NP-ZKM Dispersionen.

Beiden Elutionen gemein war der Voidpeak nach ca. 6.5 Minuten. Ab diesem Zeitpunkt endete der Fokusfluss und die Partikel konnten den Trennkanal passieren. Die Peakmaxima der NP in A4F Eluent erschienen bei 17.5 Minuten (AgPure und Nanocomposix). Die Partikel eluierten von Minute 15 bis 28 (AgPure) bzw. 22 (Nanocomposix). Der Peak von AgPure hatte eine größere Halbwertsbreite als der der Nanocomposix Partikel und wies zusätzlich eine Schulter zwischen Minute 19 und 20 auf. Der breitere Peak deutete, im Gegensatz zu den UV-Vis Messungen zuvor, darauf hin, dass AgPure eine größere Polydispersität aufweist, als die Nanocomposix Partikel. Zudem wies die Schulter des Peaks bei Minute 20 auf Aggregatbildung hin [55]. Die ZKM Dispersionen der NP eluierten ebenfalls ab Minute 15, wobei die Nanocomposix-Partikel eine Ausnahme darstellten. Bei ihnen erschien ein erster Peak bereits nach ca. 10 Minuten, was vor allem daran lag, dass die NP-Dispersion sehr kleine NP enthält, die nach Ausbleiben des Fokusflusses verfrüht eluierten. Zusätzlich eluierten hier freie Proteine aus dem ZKM, wie aus dem Elugramm der

Abbildung 26 C zu entnehmen ist. Da deren Intensität sehr schwach war, trugen sie zu dem Peak nur bedingt bei. Auch bei AgPure war ein sehr schwacher Peak bei ca. neun Minuten erkennbar, der aufgrund der geringen Ausprägung hauptsächlich auf freie Proteine zurückgeführt wurde. Die Peaks beider Partikel ab Minute 15 bis Minute 37 (AgPure) bzw. Minute 42 (Nanocomposix) waren im Gegensatz zu den A4F-Dispersionen stark verbreitert, was auf eine breite Größenverteilung der NP-Protein-Konjugate hindeutete. Zusätzlich zu den UV-Vis Daten, wurden Brechungsindexänderungen detektiert, deren Ergebnisse in Abbildung 27 dargestellt sind. Die Peakmaxima lagen für AgPure bei 22.6 Minuten und für Nanocomposix bei 23.5 Minuten und wiesen damit eine Retentionszeitverzögerung von 4.5 (AgPure) bzw. 6 Minuten in Bezug auf die A4F Eluentendispersionen auf. Diese Verzögerung ging mit dem Anstieg der hydrodynamischen Radien der Partikel einher.

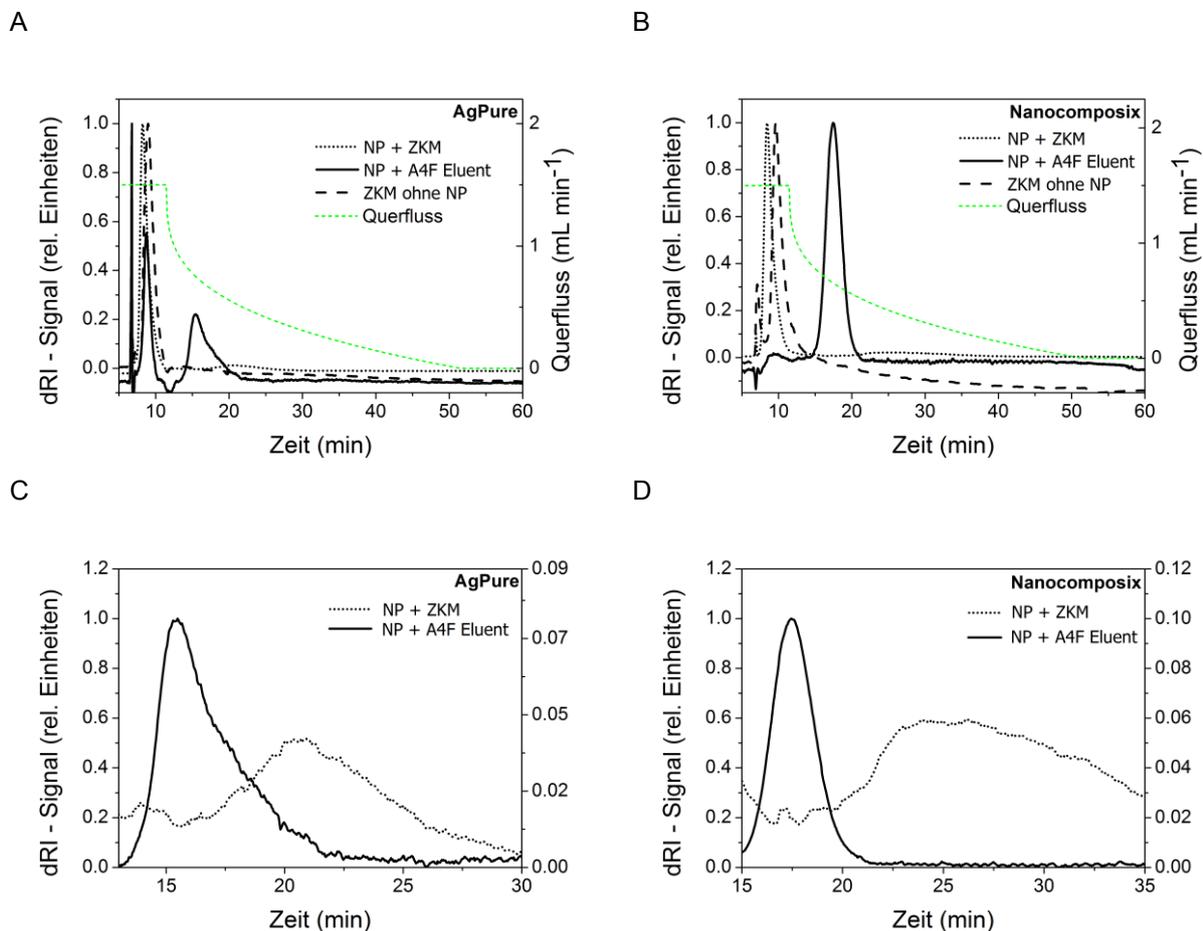


Abbildung 27: Messung der differentiellen Brechungsindizes für (A) AgPure und (B) Nanocomposix mit einer Ag-Konz. von 500 µg mL⁻¹ in Wasser (durchgezogene Linie), ZKM (gepunktete Linie) und für ZKM ohne NP (gestrichelte Linie, Gesamtproteinkonz. laut Herstellerangaben: 34 µg mL⁻¹) (C) und (D) zeigen jeweils vergrößerte Ausschnitte der oberen Graphen zur besseren Veranschaulichung der veränderten Peakmaxima nach Zugabe von ZKM.

Ebenso wie die UV-Vis Daten nach der A4F-Trennung zeigten die Brechungsindexmessungen Unterschiede zwischen den beiden Partikelsorten sowohl was ihr Verhalten im A4F

Eluenten als auch ZKM-Dispersion betraf. Die AgPure-Partikel in A4F Dispersion eluierten zwischen Minute 13 und 23, also mit einer um ca. eine Minute vorgezogenen und verkürzten Retentionszeit verglichen mit den UV-Vis Daten. Dies ließ sich ebenso für die Nanocomposix Partikel zwischen Minute 13.5 und 22 und ZKM ohne NP zwischen Minute 9 und 10 beobachten, was auf die Lage der Detektoren im Versuchsaufbau zurückzuführen war. Zunächst durchlief das Eluat den Brechungsindexdetektor und erst danach den UV-Detektor, wodurch die unterschiedlichen Elugramme erklärt werden konnten. Die bei AgPure in A4F Dispersion zusätzlich verringerte Gesamtelutionsdauer von zehn Minuten, im Gegensatz zu 13 Minuten bei der UV-Vis Messung, war der Detektorempfindlichkeit geschuldet, denn das UV-Signal ab Minute 25 war bereits schwach und die Empfindlichkeit des RI-Detektors bei dem gewählten Analyten und Laufmittel deutlich geringer, als die des UV-Detektors [88]. Die Elutionsdauer von Nanocomposix im RI-Detektor veränderte sich nicht im Vergleich mit den UV-Vis Elugrammen.

Die Elugramme der Brechungsindexänderung zeigten bei den ZKM-Dispersionen einen Unterschied zu den UV-Vis Messungen. Da bei der UV-Vis Detektion eine bestimmte Wellenlänge (bei AgPure 430 nm und bei Nanocomposix 400 nm) gewählt wurde, waren freie Proteine kaum als Elutionspeak zu erkennen. Bei der RI-Detektion wurden diese erkannt und waren als erster Peak nach dem Voidpeak zu erkennen. Die Elution der ungebundenen Proteine in der ZKM-Dispersion der NP ab 8.5 Minuten erfolgte früher als im verdünnten ZKM ohne NP bei 9.5 Minuten (Abbildung 27 A und B). Da die NP mit einer hohen Konzentration in den Trennkanal injiziert wurden, waren ihre Konzentration und die der Proteine in dem sich ausbildenden Partikelband während der Fokussierung sehr hoch. Dadurch kann es nach dem Herunterfahren des Fokusflusses zu einer verfrühten Elution der kleineren Proteine kommen, die aus diesem Band herausgedrückt wurden. Die Elution der NP-Proteinkonjugate erfolgte ab Minute 17.5 bei AgPure und ab Minute 20 bei den Nanocomposix Partikeln. In beiden Fällen lag die Gesamtelutionsdauer der Partikel unter denen der UV-Vis Messungen (13 Minuten bei AgPure und 16 Minuten bei Nanocomposix), was mit der geringeren Empfindlichkeit des RI-Detektors erklärt werden konnte.

Zusammenfassend kann zu den UV-Vis Messungen bei der A4F-Trennung gesagt werden, dass AgPure-NP bereits in ihrer Stammdispersion Aggregate enthielten und dies durch eine Schulter im Elugramm bei ca. 20 Minuten zu erkennen war [55]. Nanocomposix NP zeigten keine sichtbare originäre Aggregation. Diese Ergebnisse werden auch durch die SAXS-Analytik bestätigt (siehe Kapitel 5.1.4). Beide Partikel wiesen nach Dispersion in ZKM ein späteres Einsetzen der Elution auf, was auf eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius der Partikel deutete [55]. Sowohl Nanocomposix NP als auch AgPure wiesen in ZKM

Elutionspeaks höherer Halbwertsbreite auf, was auf eine größere Polydispersität hinwies [89]. Die RI-Detektor-Signale zeigten qualitativ übereinstimmende Ergebnisse.

Sowohl von den NP in A4F Eluentendispersion als auch in ZKM-Dispersion wurden von Minute 17 bis Minute 41 Fraktionen von je zwei Minuten entnommen und anschließend alle mit DLS, sowie die Fraktionen der ZKM Dispersionen zusätzlich mit 1-DE untersucht.

5.1.3 Dynamische Lichtstreuung

Exogene Stoffe, die in einem *in-vitro* Versuch wie dem Caco-2 Modell eingesetzt werden, kommen dort zunächst mit ZKM oder ITS-Medium in Kontakt. Daher wurde vor allen anderen Experimenten die Stabilität der Dispersion von AgPure in ITS und ZKM untersucht. Das ZKM wird vor der Zugabe der zu untersuchenden Partikel zu den Zellen normalerweise durch ITS ersetzt, in welchem die NP dispergiert werden. Da die Auswertung der DLS Daten für AgPure in ITS eine Zunahme des Maximums des R_H von 15.5 nm zu 65.0 nm nach 10 Minuten aufwies (siehe Abbildung 28), und die Dispersion sichtbar ausflockte, wurde auf den Wechsel des Mediums vor Zellexposition verzichtet. AgPure wurde aufgrund dieser Erkenntnisse ausschließlich in ZKM dispergiert. Nanocompositix wurde für die Zellkulturexperimente nicht verwendet und daher nicht untersucht.

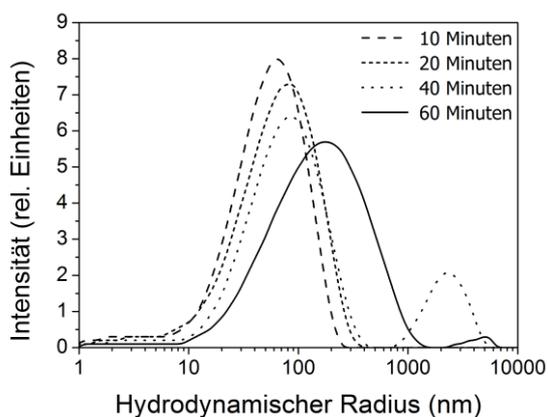
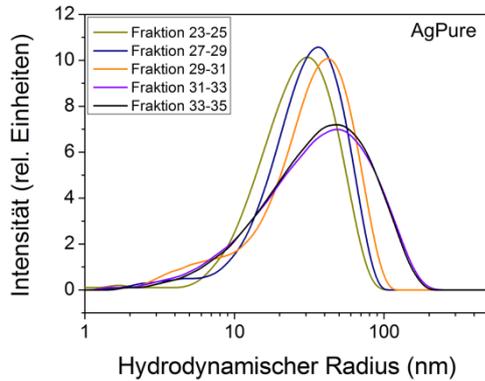


Abbildung 28: DLS Daten von AgPure als Dispersion in ITS-Medium mit einer Ag-Konzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei 37°C nach 10, 20, 40 und 60 Minuten.

Alle A4F-Fractionen beider NP wurden mittels der DLS untersucht, um die zeitliche Größenänderung der NP zu dokumentieren (Abbildung 29). Die DLS-Messungen zeigen einen deutlichen Anstieg des Partikeldurchmessers mit steigender Retentionszeit, was auf verstärkte Aggregation der Partikel oder die Bildung einer Proteinkorona zurückzuführen ist. Bei AgPure ist ab Minute 31 eine Peakverbreiterung zu erkennen, was auf eine höhere Polydis-

persität hindeutet. Nanocomposix zeigt innerhalb des betrachteten Elutionszeitraumes keine signifikante Änderung der Halbwertsbreite.

A



B

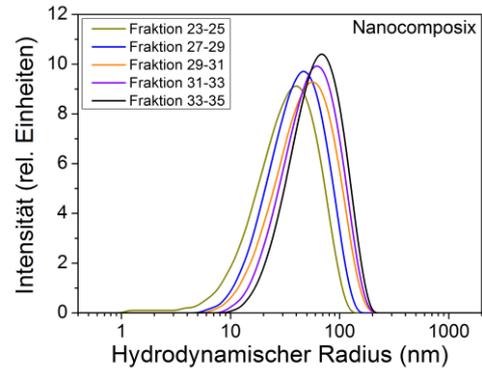
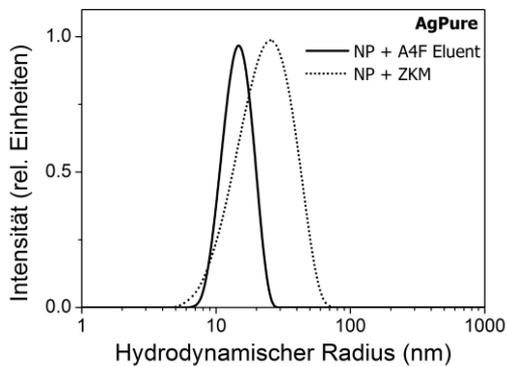


Abbildung 29: Intensitätsgewichtete DLS-Daten im zeitlichen Verlauf der Fraktionen der A4F Trennung von AgPure (A) und Nanocomposix (B) nach 24 h Exposition bei 37°C in ZKM mit einer Ag-Konz. von 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Zu erkennen ist ein zeitlich abhängiges Partikelwachstum, welches mit der erhöhten Polydispersität und späteren Retentionszeiten der A4F-Trennung korrespondiert.

Bei AgPure wurden die Fraktionen a und b aus Abbildung 26 A für weitergehende Untersuchungen mit DLS und TEM gewählt, da sie zum einen die höchsten NP-Konzentrationen (Fraktion a) aufwiesen und zum anderen nur in Fraktion b eine Proteinmenge enthielten, die für TEM-Aufnahmen mit EDX und MALDI-MS-MS Untersuchungen ausreichend waren (siehe Abschnitt 5.1.7). Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Fraktionen mit den höchsten Peakintensitäten bzw. Proteinmengen auch bei Nanocomposix für weitere Auswertungen genutzt (Fraktionen c und d aus Abbildung 26). Die Ergebnisse der DLS Messungen der A4F-Fraktionen von Minute 16-18 der AgPure-A4F Eluent-Dispersion und Minute 21-23 der AgPure-ZKM-Dispersion sind in Abbildung 30 zusammenfassend dargestellt.

A



B

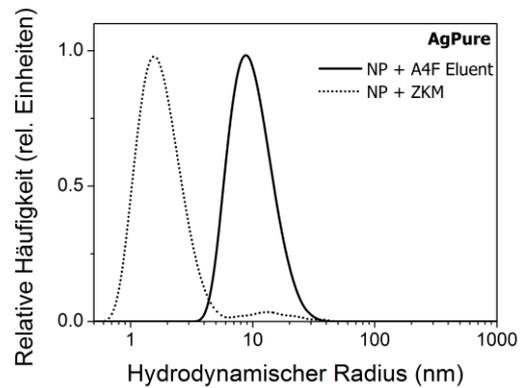


Abbildung 30: (A) intensitätsgewichtete und (B) volumengewichtete Ergebnisse der DLS Messung der Fraktionen a (durchgezogene Linie) und b (gepunktete Linie) aus Abbildung 26 A der A4F Trennung der beiden Dispersionen von AgPure in A4F Eluent sowie ZKM mit einer jeweiligen Ag-Konz. von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

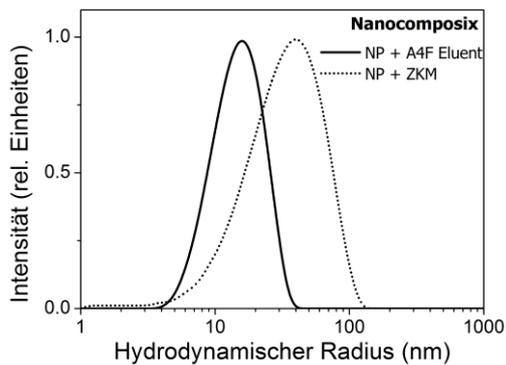
Abbildung 30 A zeigt einen Anstieg der Maxima der intensitätsgewichteten R_H der NP-ZKM-Dispersion nach A4F-Trennung bei $14.1 \pm 0.1 \text{ nm}$ zu $25.4 \pm 0.3 \text{ nm}$. Ebenfalls war eine Peakverbreiterung zu erkennen, was mit der größeren Polydispersität der Partikel, wie sie schon in den A4F-Elugrammen erkennbar war, zu erklären war. Zudem wurde der *z-average* Radius D_z bestimmt, welcher sich aus der Summe über alle Intensitäten S_i der Partikelsorte i und den dazugehörigen Partikelradien D_i folgendermaßen ergibt:

$$D_z = \frac{\sum S_i}{\sum \frac{S_i}{D_i}} \quad (49)$$

Der *z-average* ist damit das intensitätsgewichtete harmonische Mittel der DLS Daten. Für AgPure in A4F Dispersion ergab er sich zu 12.4 nm und in ZKM Dispersion zu 21.9 nm , was jeweils leicht unter den Werten der Peakmaxima lag. Da die Intensitätsgewichtung stark partikelgrößenabhängig ist, die Intensität ist proportional zur sechsten Potenz des Radius, wurden die Daten zusätzlich volumengewichtet dargestellt. Dabei zeigte sich, dass das Peakmaximum des R_H der NP in A4F Dispersion signifikant zwischen beiden Auswertemethoden variierte: $14.1 \pm 0.1 \text{ nm}$ intensitätsgewichtet zu $9.1 \pm 0.1 \text{ nm}$ volumengewichtet. Die ZKM-Dispersion von AgPure hatte ihr Peakmaximum volumengewichtet bei $(1.6 \pm 0.1) \text{ nm}$ und zeigte einen zweiten, deutlich schwächeren Peak, bei $(14.1 \pm 0.1) \text{ nm}$. Der Peak bei 1.6 nm mit einer Halbwertsbreite von 0.8 nm deutet auf den Einfluss freier Proteine aus dem ZKM bzw. Stabilisatormaterialien hin, die sich in diesem Größenbereich befinden [90]. Hier war ebenfalls ein deutlicher Unterschied zu den intensitätsgewichteten Daten festzustellen, die ihr Peakmaximum bei 25.39 nm hatten. Diese Daten deuteten darauf hin, dass freie Proteine

bzw. freies Stabilisatormaterial die Probe dominieren, während die eigentlichen NP inklusive ihrer Proteinkorona anteilmäßig gering ausfielen. Auch die RI-Daten deuteten darauf hin, da das Detektorsignal für die freien Proteine zwischen Minute acht und neun im Gegensatz zu den ab Minute 16 eluierenden AgPure NP mit Korona sehr ausgeprägt war (Abbildung 27 A und C).

A



B

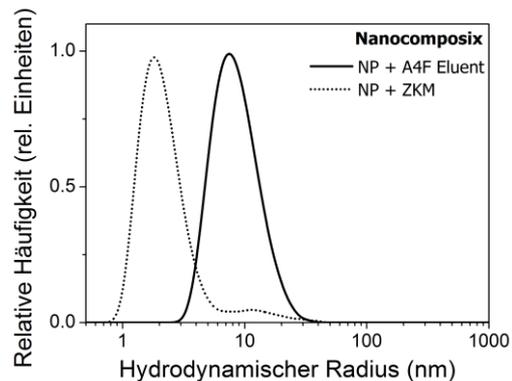


Abbildung 31: (A) Intensitätsgewichtete und (B) Volumengewichtete DLS Messung von Fraktion c (durchgezogene Linie) und d (gepunktete Linie) aus Abbildung 26 B der A4F Trennung der beiden Dispersionen von Nanocomposix Partikeln in A4F Eluent sowie ZKM mit einer jeweiligen Ag-Konz. von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ähnlich wie AgPure verhielten sich auch die Nanocomposix Partikel. Das Maximum des R_H lag bei der intensitätsgewichteten A4F Dispersion bei (16.3 ± 0.2) nm und bei 39.4 ± 1.1 nm für die ZKM-Dispersion. Die Unterschiede zwischen den beiden Dispersionen fielen bei den Nanocomposix Partikeln damit deutlich stärker aus, als bei AgPure. Dies spiegelte sich auch in den UV- und RI-Daten der A4F-Trennung wider (Abbildung 26 und 27), die wesentlich breitere Elutionspeaks als die AgPure-Partikel aufwiesen. Der *z-average* Radius der Nanocomposix Partikel lag bei 13.1 nm für die wässrige Dispersion und bei 47.2 nm für die ZKM-Dispersion. Bei der volumengewichteten Auswertung lag das Maximum der A4F Dispersion bei 7.8 ± 0.1 nm, das erste Maximum der ZKM-Dispersion bei 1.8 ± 0.1 nm sowie deren zweites bei 12.2 ± 0.1 nm.

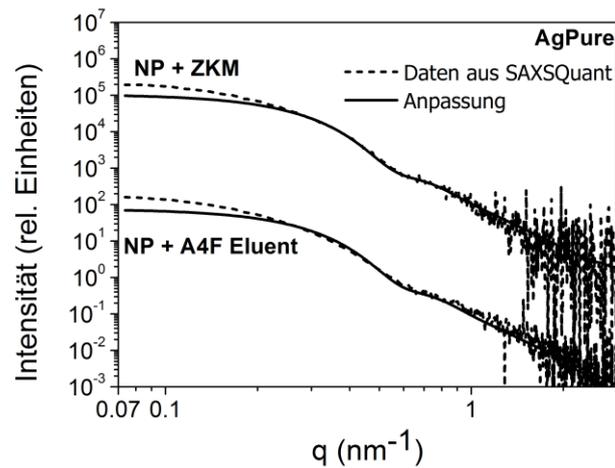
Die A4F-Elugramme und die davor aufgenommenen UV-Vis-Spektren zeigten, dass AgPure bereits in der Stammdispersion Aggregate enthält, die R_H der NP nach Dispersion in ZKM zunahm und damit die Polydispersität beider NP-Dispersionen zunahm. Diese Beobachtungen wurden von den DLS-Daten unterstützt. Beide Partikel zeigten bei der Betrachtung der zeitaufgelösten Analyse ihrer A4F Fraktionen eine Zunahme des R_H und der Polydispersität. Der Vergleich der intensitätsgewichteten *z-average* des R_H der Fraktionen der jeweiligen Peakmaxima der A4F-Trennung, die Fraktionen a-d aus Abbildung 26, zeigte für die A4F

Dispersion nur einen geringen Unterschied (12.4 nm bei AgPure zu 13.1 nm bei Nanocomposix). Dieses Ergebnis entsprach den sehr ähnlichen Retentionszeiten der beiden NP in der A4F. Die intensitätsgewichteten *z-averages* beider NP in ZKM-Dispersion wiesen deutliche Unterschiede auf (21.9 nm bei AgPure zu 47.2 nm bei Nanocomposix). Die volumengewichteten Daten zeigten nur geringe Unterschiede (13.0 nm bei AgPure zu 14.1 nm bei Nanocomposix) und wiesen einen ausgeprägten Peak bei ca. 1.6 – 1.8 nm auf, der für ungebundene Proteine steht [91]. Diese Ergebnisse belegten, dass nur ein geringer Teil der Partikel eine Corona besitzt oder aggregiert vorlag, was sich auch in den ähnlichen Elutionszeiten der NP in der A4F widerspiegelt. Der Einfluss des ZKM auf die Partikelaggregation und damit die mögliche Toxizität ist daher als gering einzuschätzen [92, 93].

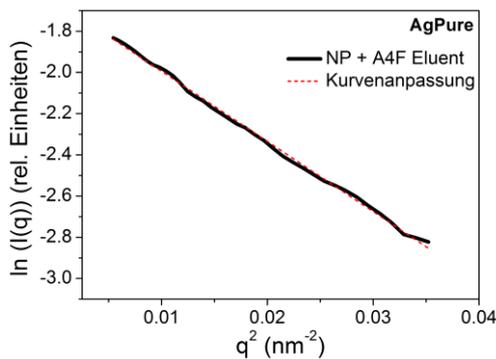
5.1.4 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die bisherigen Analysemethoden dienten der Untersuchung des R_H , welcher jedoch keine direkte Aussage über Aggregation der Partikel liefert, sondern ebenso durch Adsorption von Molekülen aus dem Solvens wachsen kann. Auch ein Quellen der Detergentien, die als Partikelstabilisatoren dienen, wäre eine mögliche Erklärung für den Anstieg des R_H [94]. Um eine Aggregation der Partikel zu untersuchen, wurde SAXS verwendet, da das Messprinzip vor allem auf dem Elektronendichteunterschied zweier Medien beruht und damit die elektronenreichen Silberkerne sehr gut von umgebendem Medium und Stabilisatormolekülen unterschieden werden können. Für diese Auswertung konnten die A4F-Fractionen nicht genutzt werden, da die Konzentration der NP in den Dispersionen für SAXS-Messungen nicht ausreichte. Eine Aufkonzentrierung der A4F-Eluate wurde vermieden, um dadurch bedingte Aggregation bzw. Veränderung der NP-Korona zu verhindern [39]. Für die Messungen wurden stattdessen NP-Dispersionen, zum einen in ZKM und zum anderen im A4F Eluenten, mit einer Ag-Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ angesetzt. Die experimentellen Daten der SAXS-Messungen für AgPure und Nanocomposix Partikel sowie die Anpassung simulierter Streukurven für sphärische Partikel mit einer Gauß-Verteilung an diese Daten zeigen Abbildung 32 und 33.

A



B



C

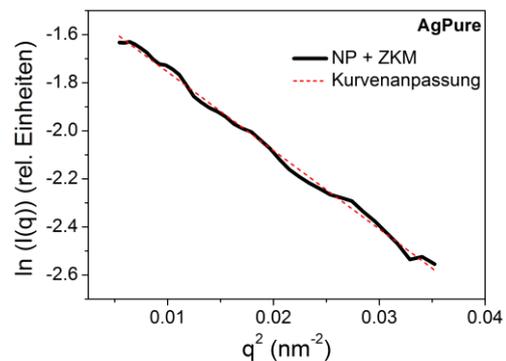


Abbildung 32: (A) SAXS-Kurven von AgPure in Dispersion mit dem Laufmittel der A4F (obere Kurve) und in ZKM-Dispersion (untere Kurve) bei einer Ag-Konz. von jeweils $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Die experimentellen Daten sind jeweils mit einer durchgezogenen Linie gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie zeigt die simulierten Anpassungskurven für eine Kugel mit einer gaußschen Größenverteilung mit dem Radius $7.5 \pm 0.1 \text{ nm}$ (in A4F Eluent) und $7.8 \pm 0.1 \text{ nm}$ (in ZKM), die die bestmögliche Übereinstimmung mit den Originaldaten ergaben. Die Daten der NP in ZKM sind mit 103 multipliziert, um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten. (B) und (C) zeigen die Guinier-Anpassungen für die NP in A4F Eluent (B) bzw. in ZKM (C), aus denen sich die Gyrationradien der Partikel ableiten lassen. Die roten Linien zeigen die Anpassung einer Gerade an die experimentellen Daten. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R^2) betrug 0.998 (B) und 0.996 (C).

Die experimentellen Daten zeigten eine gute Übereinstimmung mit simulierten Kurven für eine sphärische Partikelform bei q -Werten von $>0.2 \text{ nm}^{-1}$. Die Anpassung an eine Kugel wurde gewählt, da die Herstellerangaben diese Form benennen und eigene TEM Aufnahmen (siehe Kapitel 5.1.5) diese Angaben bestätigten. Die beste Anpassung gelang dabei für einen simulierten Kugelradius von $7.5 \pm 0.1 \text{ nm}$ für die Dispersion im A4F Eluenten und einem Kugelradius von $7.8 \pm 0.1 \text{ nm}$ für die ZKM-Dispersion. Im vorderen q -Bereich ($q < 0.2 \text{ nm}^{-1}$) zeigten beide Kurven im Vergleich zu den Originaldaten einen steileren Kurvenverlauf, der ebenfalls ein Indiz für eine leichte Aggregation ist [95]. Dieser Anstieg war in beiden Dispersionen ähnlich groß, was auf eine Aggregation der ursprünglichen Teilchendispersion deutete und belegte, dass der Einfluss des ZKM auf die Aggregation kaum Einfluss hatte. Dies war

auch aus der Schulter der UV-Vis Absorption der A4F-Trennung für AgPure in A4F Dispersion ersichtlich (Abbildung 26 A). Die Auswertung der SAXS-Daten der Nanocomposit Partikel zeigte ein ähnliches Bild (Abbildung 33). Die Anpassung der Originaldaten der Nanocomposit Partikel an eine simulierte Kugel mit einem Radius von $9,6 \pm 0,1$ nm für die A4F Dispersion und $9,7 \pm 0,1$ nm für die ZKM-Dispersion ergab für die A4F-Dispersion eine sehr gute Übereinstimmung beider Kurven über den gesamten q Bereich. Bei der ZKM-Dispersion zeigte sich wie auch bei AgPure eine Abweichung der simulierten Kurve von den experimentellen Daten. Da diese Abweichung jedoch nicht wie bei AgPure schon vor der Zugabe von ZKM vorhanden war, ist bei NC von einer Beeinflussung der Partikeldimensionen durch das Medium auszugehen. Im vorderen q -Bereich, dem Guinierbereich, wurde daher für beide Partikel mit den Originaldaten eine Guinieranpassung durchgeführt, aus deren Geradensteigung ihrer Kurvenanpassung der Gyrationradius errechnet werden kann (Abbildung 32 B und C). Dieser ergab sich für AgPure in A4F-Dispersion zu $10,1 \pm 0,1$ nm und für die Partikel in ZKM-Dispersion zu $9,9 \pm 0,1$ nm. Für die Nanocomposit Partikel wurden Guinierradien von $8,8 \pm 0,01$ nm in der A4F-Dispersion und $8,9 \pm 0,1$ nm für die ZKM-Dispersion erhalten. Nach $R_g^2 = \frac{3}{5}R^2$ (siehe Kapitel 3.2.1) ergibt sich das Volumen einer Kugel, welches durch den Guinierradius bestimmt wird, zu 9290 nm^3 für AgPure in A4F Dispersion und zu 8746 nm^3 in ZKM-Dispersion. Für die Nanocomposit Partikel ergaben sich Partikelradien von 6143 nm^3 in A4F-Dispersion und 6356 nm^3 in ZKM-Dispersion. Allen SAXS-Kurven gemeinsam war die Steigung im Guinier-Bereich, die bei allen Kurven im Bereich von q^0 liegt, was auf eine kugelförmige Partikelform hinwies [58]. Der Porod-Bereich zeigte eine Steigung von etwa q^{-1} , was auf eine komplexere Oberflächenstruktur und keine klaren Grenzflächen zwischen den Partikeln und dem Medium hinwies [58].

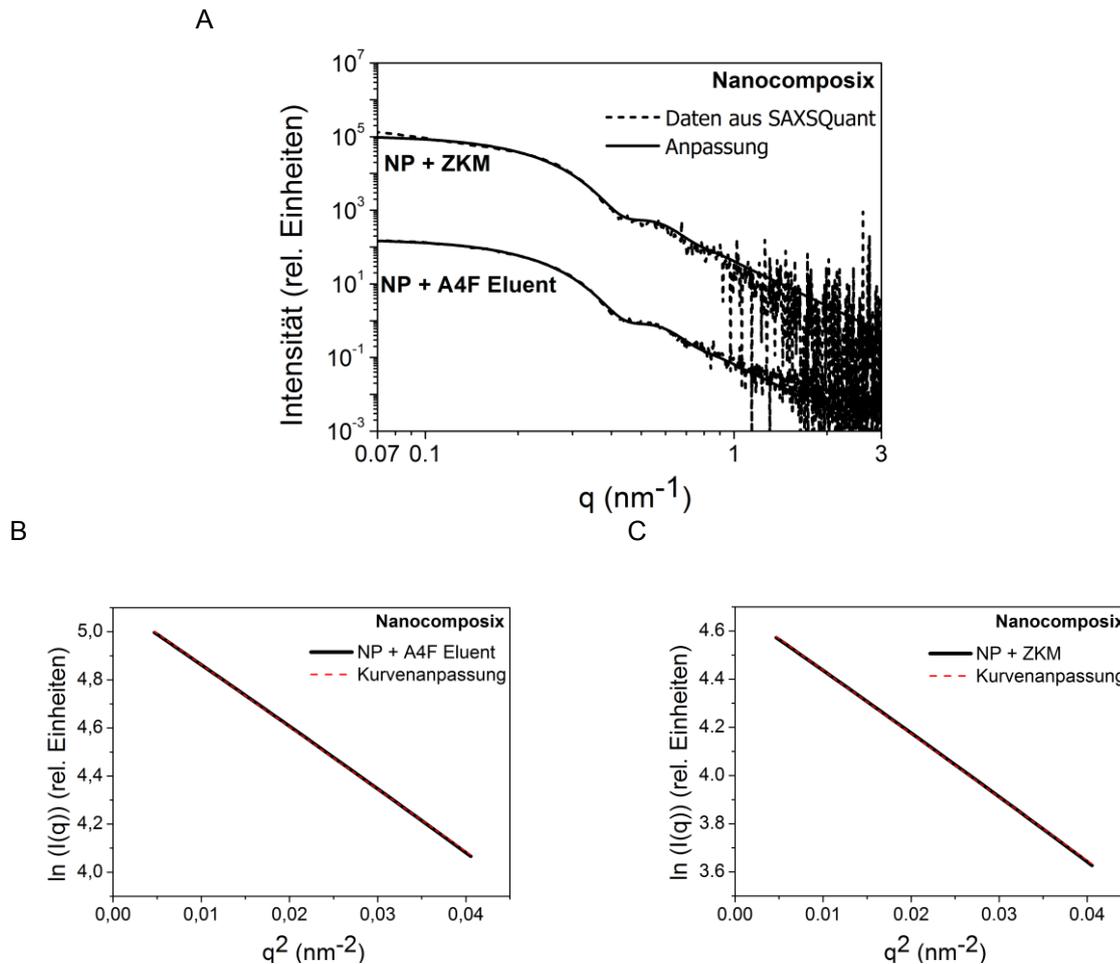


Abbildung 33: (A) SAXS-Kurven von Nanocomposix in Dispersion mit dem Laufmittel der A4F (obere Kurven) und in ZKM-Dispersion (untere Kurven) bei einer Ag-Konz. von jeweils $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Die mit SAXSQuant bearbeiteten sind jeweils mit einer durchgezogenen Linie gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie zeigt die simulierten Anpassungskurven für eine Kugel mit einer gaußschen Größenverteilung mit dem Radius $9.6 \pm 0.1 \text{ nm}$ (in A4F Eluent) und $9.7 \pm 0.1 \text{ nm}$ (in ZKM), die die bestmögliche Übereinstimmung mit den SAXSQuant-Daten ergaben. Die Daten der der NP + ZKM sind mit 103 multipliziert, um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten. (B) und (C) zeigen die Guinier-Anpassungen die NP in A4F Eluent (B) und in ZKM (C), aus denen sich die Gyrationradien der Partikel ableiten lassen. Die gestrichelten Linien zeigen die Anpassung einer Geraden an die experimentellen Daten. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R^2) betrug 0,999 bei (B) und 0,999 bei (C). Die Kurvenanpassung in Abbildung 33 C war optisch nicht von den Rohdaten zu unterscheiden.

Zusätzlich zur Anpassung simulierter Streukurven an die experimentellen Daten mittels der Software SASfit [70] wurde eine Anpassung durch eine Monte-Carlo-Simulation durchgeführt, die als rote Kurve in den jeweiligen Insets der Grafiken in Abbildung 34 zu erkennen ist. Die Monte-Carlo Anpassungen waren im Kurvenverlauf denen der SASfit Anpassung bis $q = 0.3 \text{ nm}^{-1}$ ähnlich, zeigten bei kleineren q -Werten aber eine wesentlich größere Übereinstimmung mit den Originaldaten. Die sich aus den Anpassungen ergebenden Partikelradien waren, zumindest im Fall von AgPure, voneinander abweichend. So ergaben sich für AgPure aus der volumengewichteten Verteilung, die aus der Monte-Carlo-Simulation für ein Kugelmodell hervorging, Partikelradien von $6.5 \pm 0.1 \text{ nm}$ in A4F-Laufmittel-Dispersion und $6.9 \pm 0.1 \text{ nm}$ für die ZKM-Dispersion. Für Nanocomposix NP ergaben sie sich zu

9.6 ± 0.1 nm in A4F-Laufmittel-Dispersion und 9.3 ± 0.1 nm in ZKM-Dispersion. Man erkennt in der volumengewichteten Verteilung von AgPure in A4F-Laufmittel (Abbildung 34 A) einen Anteil von Partikeln mit einem Radius von 10 nm und mehr, was die schon bei der A4F-Auswertung angesprochene Polydispersität bestätigte. Es ist ebenso erkennbar, dass die Polydispersität nach Zugabe von ZKM abnimmt (Abbildung 34 B). Dieser Effekt war bei den Nanocomposix NP nicht zu beobachten. Hier war eher das Gegenteil der Fall. Die Partikel in A4F-Laufmittel wiesen eine enge Größenverteilung auf, während die Partikel in ZKM sowohl eine breitere Größenverteilung, als auch neu entstandene Anteile an Partikeln mit Radien über 25 nm aufwiesen (Abbildung 34 C und D).

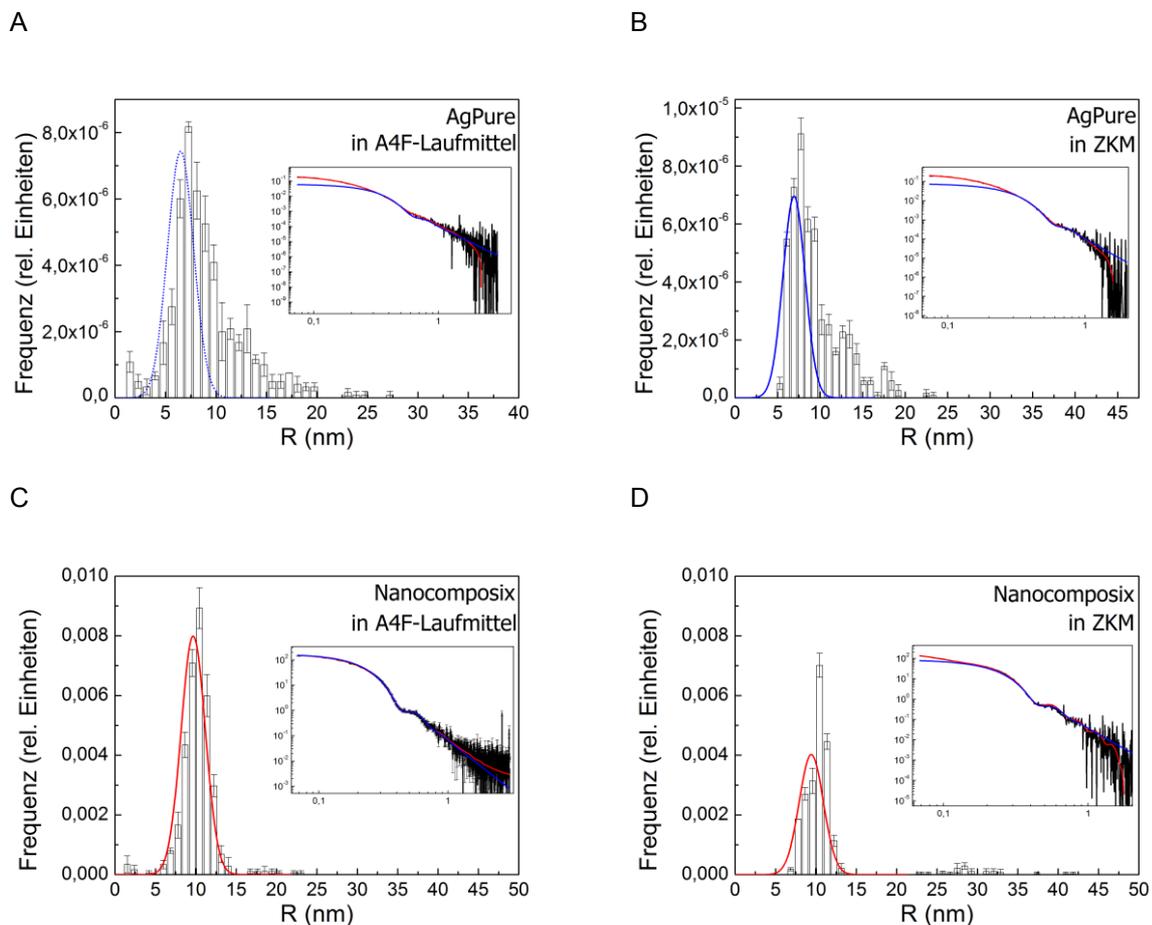


Abbildung 34: Volumengewichtete Größenverteilungen ermittelt durch eine Monte-Carlo-Anpassung eines Kugelmodells an die SAXS-Kurven für die verschiedenen NP-Dispersionen. (A) und (B) zeigen die Anteile der jeweiligen Partikelgrößenfraktionen für AgPure in A4F-Laufmitteldispersion (A) und in ZKM (B) sowie die dazugehörige Verteilungsfunktion als blaue Kurve (AgPure) bzw.rote Kurve (Nanocomosix). Die Insetts sind die jeweiligen SAXS-Kurven mit den Originaldaten (schwarze Linie), der Monte-Carlo-Anpassung eines Kugelmodells (rote Linie), sowie der Anpassung eines Kugelmodells mit einer Schulz-Zimm-Verteilung durch SasFit (blaue Linie). (C) und (D) zeigen dies für die Nanocomposix NP.

Die Daten der SAXS-Messungen zeigten, dass der bisher in UV-Vis-, A4F- und DLS-Daten ermittelte Anstieg des R_H beider Partikelsorten nicht vornehmlich einer Aggregation der Partikel geschuldet sein konnte. AgPure zeigte, wie auch schon in den UV-Vis-Daten und A4F-

Daten zu erkennen war, eine leichte Aggregation schon in der Stammdispersion, was in der SAXS als erhöhte Steigung einer Kurvenanpassung an die Originaldaten im Guinierbereich sichtbar wurde. In ZKM-Dispersion zeigte AgPure keine signifikante Veränderung in diesem Bereich, was auf keine verstärkte Aggregation, hervorgerufen durch ZKM, deutete. Die zahlengewichtete Partikelverteilung aus der Monte-Carlo Simulation zeigten eher eine Stabilisierung der Partikel und eine Reduktion des Anteils der Aggregate bei 20-25 nm, welches in Übereinstimmung mit Literaturdaten steht, die dies aufgrund sterischer Abschirmung durch Serum Albumin aus dem ZKM erklärt [96]. Nanocomposix NP zeigten eine sehr gute Übereinstimmung der experimentellen und simulierten Daten in A4F-Dispersion und keinen erhöhten Anstieg der Kurve im Guinierbereich. In ZKM-Dispersion bildete sich eine leichte Abweichung der experimentellen Daten von der Simulation aus. Die zahlengewichteten Verteilung der Partikel aus der Monte-Carlo Simulation zeigte dementsprechend einen Anstieg der Zahl der Partikel im Bereich 25-30 nm. Dieser Anteil war jedoch im Vergleich zu den unaggregierten Partikeln sehr gering (etwa 5 %). Eine Übersicht über die physikalisch-chemischen Untersuchungsergebnisse ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3 Übersicht der Ergebnisse der verschiedenen Analysemethoden, mit denen die NP AgPure und Nanocomposix untersucht wurden.

	AgPure		Nanocomposix	
	in A4F Eluent	in ZKM	in A4F Eluent	in ZKM
Zetapotential (bei pH 6.8 – pH 6.9)	-19 mV	nicht messbar	- 23 mV	nicht messbar
A4F				
Retentionszeitspanne (Minuten)	14.6 – 28.1	14.7 – 39.0	14.2 – 22.4	15.5 – 40.2
Peakmaximum (Minuten)	17.5	22.8	17.5	23.6
DLS				
Peakmaximum R_H (25°C) Intensitätsgewichtet (nm)	14.1	25.4	16.3	39.4
Peakmaximum R_H , Volumengewichtet (25°C) Hauptpeak, Nebenpeak (nm)	9.1	1.6, 14.1	7.8	1.8, 12.2
Z-Average R_H (25°C) Intensitätsgewichtet (nm)	12.4 (PDI: 0.18)	21.9 (PDI: 0.20)	13.1 (PDI: 0.13)	47.2 (PDI: 0.19)
Z-Average R_H (25°C) Volumengewichtet Hauptpeak, Nebenpeak (nm)	12.4	1.7, 13.0	13.1	2.2, 14.1
SAXS				
Partikelkernradius (21°C) (SasFit Auswertung, nm)	7.5	7.8	9.6	9.7
Partikelkernradius (21°C) (Monte Carlo Simulation, nm)	6.5	6.9	9.6	9.3

Die Partikeleigenschaften zeigten gute Übereinstimmung mit den Herstellerangaben. AgPure hat laut Hersteller einen Partikeldurchmesser von ≤ 15 nm, was auch aus der SAXS-Analyse dieser Arbeit hervorging. Angaben zum hydrodynamischen Radius oder dem Zeta-Potential macht der Hersteller in seinem Datenblatt nicht. Nanocomposix NP haben laut Hersteller ein Zeta-Potential von -24.9 mV (eigene Daten: -23 mV), einen hydrodynamischen Durchmesser in Stammdispersion von 40.7 nm (eigene Daten: 39.4 nm) und einen Partikelkerndurchmes-

ser von 20.4 nm (eigene Daten: 19.2 nm); die Herstellerangaben konnten bei beiden Partikeln durch eigene Analysen bestätigt werden [97, 98].

5.1.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Die bisherigen Daten zeigten, dass die Aggregation der Partikel in ZKM nicht allein zu dem unerwartet erhöhten R_H beitragen kann. Um die mögliche Ausbildung einer Proteinkorona zu untersuchen, wurden TEM-Bilder der AgPure Partikel in A4F-Dispersion (Abbildung 35, Abbildung 36 A) und von AgPure und Nanocomposix Partikeln in ZKM-Dispersion (Abbildung 36 B und Abbildung 37 A) mit dazugehörigen EDX-Spektren (Abbildung 36 C und Abbildung 37 B) aufgenommen. Die Bilder zeigten, dass beide Partikelsorten, in Übereinstimmung mit den SAXS-Daten (SAXS-Kurven fallen im Guinier-Bereich mit q^{-0} ab), sphärische Strukturen aufweisen. Die AgPure NP besitzen eine Stabilisatorschicht von ca. 2-3 nm, die Nanocomposix NP von etwa 3-4 nm (Abbildung 35 A und B). Nach der Inkubation in ZKM zeigten beide Partikelsorten eine Akkumulation von Schwefel-Atomen in der Nähe der Oberfläche (Abbildung 36 C, Abbildung 37 B), während die Partikeldurchmesser nur geringfügig zunahmten (Abbildung 36 B, Abbildung 37 A). Allerdings gelang es, bedingt durch die Probenpräparation, nicht, einzelne Nanocomposix Partikel sichtbar zu machen, sondern nur Agglomerate wie sie in Abbildung 37 A und B zu erkennen sind. Auch andere Ionen die eine Affinität zu Silber aufwiesen und im ZKM zu finden sind, wie z.B. Chlorid, waren in der erweiterten Korona der Partikel zu finden (Bilder nicht dargestellt).

Die Schwefelatome sprechen dafür, dass Proteine oder Aminosäuren, die die einzigen Komponenten im ZKM sind, die Schwefel enthalten, an die Partikel adsorbiert wurden. Die Bindung dieser Proteinkorona an die Partikel kann über Adsorption an die Stabilisatoren erfolgen, wenn die Oberfläche der Partikel dicht mit Stabilisatormolekülen besetzt ist. Durch die hohe Stabilisatorkonzentration (Tween20: 32.6 mM, Tagat TO V: 20.1 mM) war eine dicht gepackte Oberflächenbelegung und eine Anordnung der Polyethylenoxid (PEO)-Ketten in Bürstenform bedingt durch osmotische Abstoßung anzunehmen (Abbildung 38a) [93, 99-101]. Die Kettenlänge der bei AgPure verwendeten Stabilisatoren ließe auch eine pilzförmige Anordnung an der Oberfläche zu (Abbildung 38c), wobei durch die Stabilisatorkonzentration in diesem Fall eine bürstenartige Struktur bevorzugt wäre [93]. Bei AgPure bildeten der Sauerstoff des Sorbitolringes von Tween20 und der Sauerstoff der Carbonylgruppen der Ester in Tagat TO V Dipol-Dipol Wechselwirkungen zum Silberkern aus [102, 103]. Die hydrophilen PEO-Ketten waren demzufolge zum Wasser bzw. in das umgebende Medium gerichtet [104]. Die PEO-Ketten der AgPure Stabilisatoren weisen eine mittlere Masse von 221 Da (Tween20) bzw. 370 Da (Tagat TO V) auf, was eine geringe Dicke der Stabilisatorschicht

von ca. 2-3 nm erklärt (Abbildung 35). Die Proteinkorona um die AgPure-Partikel war schmäler als um die Nanocomposix Partikel, was daran lag, dass sich um die polaren Endgruppen der Stabilisatoren zunächst Wassermoleküle mittels Wasserstoffbrückenbindungen gruppieren. Diese Wasserschicht musste von den Proteinen vor ihrer Annäherung überwunden werden, während der Stabilisator PVP bei den Nanocomposix Partikeln nicht solch eine Schicht ausbildete [94]. Die büstenförmige Anordnung der Stabilisatoren von AgPure und Nanocomposix erschwerte ebenfalls eine Annäherung der Proteine an die Partikeloberfläche durch sterische Abstoßung, während Anziehungskräfte zwischen der NP-Oberfläche und den Proteinen wirkten. Dabei war zu beachten, dass der Abfall der freien Energie der attraktiven van-der-Waals Wechselwirkungen (F_v) klein im Vergleich zum Anstieg der freien Energie der Abstoßung (F_R) ist [105]. Das Massenverhältnis von Stabilisator zu Gesamtpartikel (für AgPure 7.2 %, für Nanocomposix: 5.2 %), welches für beide AgPure mit der Ausbildung einer büstenförmigen Struktur einherging, sprach ebenso für eine verstärkte Abstoßung der Partikel gegenüber den Proteinen.[106] Trotz dieser abschirmenden Wirkungen der NP-Stabilisatoren, kam es nachweislich zur Ausbildung einer Proteinkorona.

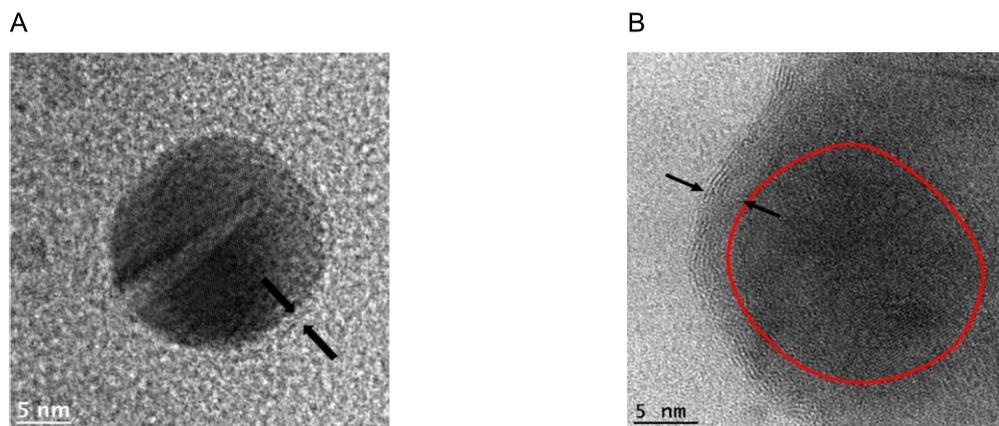


Abbildung 35: S-TEM Aufnahme von AgPure (A) und Nanocomposix (B) in A4F-Dispersion. Der Bereich zwischen den schwarzen Pfeilen gibt die Breite der Stabilisatorschicht wieder. Die Partikel weisen in diesem Bereich bei EDX-Messungen einen hohen Sauerstoffanteil auf, was auf Stabilisatormoleküle hinweist. Die rote Umrandung in (B) gibt die Partikelform eines Partikels wieder, die von weiteren Partikeln in der Umgebung überlagert wird.

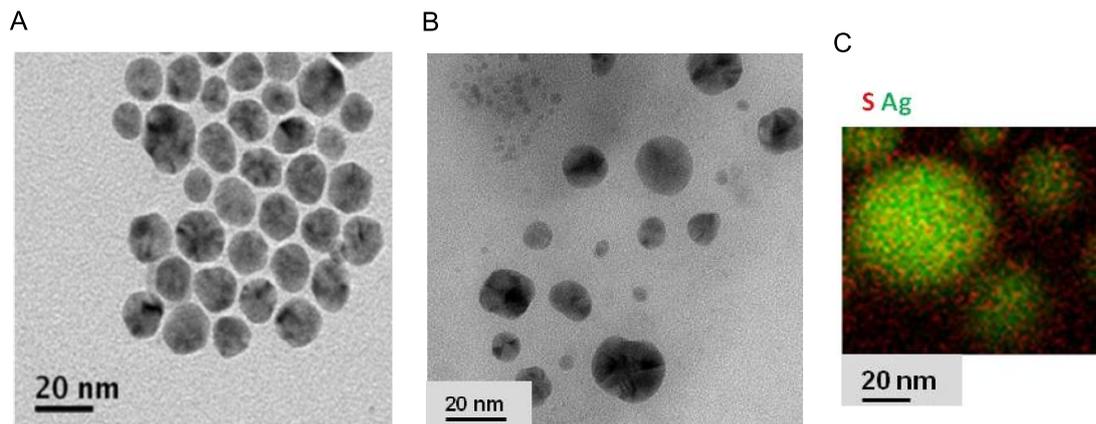


Abbildung 36: TEM-Aufnahme von AgPure Partikeln in A4F- Dispersion (A), AgPure Partikel nach 24 h bei 37°C in ZKM-Dispersion (B), S-TEM Aufnahme mit EDX-Spektrum der AgPure-Partikel der ZKM-Dispersion (C). Schwefelatome sind rot, Silberatome grün eingefärbt.

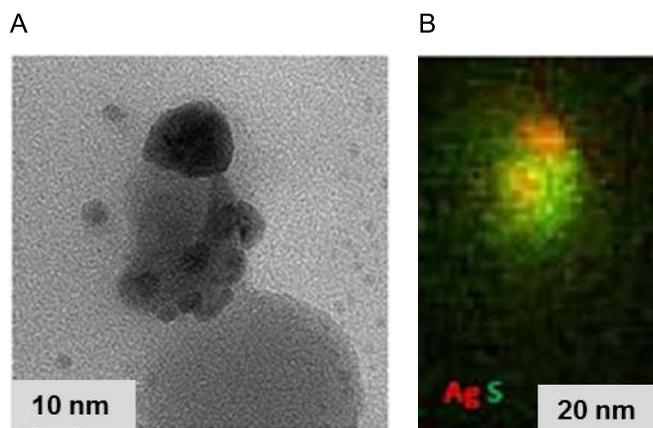


Abbildung 37: (A) TEM Aufnahme von Nanocomposix Partikeln nach 24 h in ZKM bei 37°C, (B) S-TEM Aufnahme von Nanocomposix Partikeln nach 24 h in ZKM bei 37°C. Silberatome sind rot, Schwefelatome grün eingefärbt.

Eine Bindung an die Stabilisatoren kann über die Ausbildung von van-der-Waals Kräften zwischen den hydrophoben Teilen der Proteine (α -Helices) und z.B. den langkettigen Laurylsäurerestern ausgebildet werden. Diese hydrophoben Teile des Proteins sind in wässriger Umgebung eigentlich durch die Tertiärstruktur verborgen, jedoch haben insbesondere Edelmetall-NP die Eigenschaft, für eine Konformationsänderung der Proteine und damit einer Freisetzung dieser Teilbereiche zu sorgen [23]. Bei diesem endergonischen Prozess müssen jedoch erst die Entropieverluste durch die Einschränkung der Proteinstruktur überwunden werden, was über den Entropiegewinn durch den Verlust der Wassermoleküle auszugleichen wäre [82, 107]. Ebenso können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Proteine und den Sauerstoffatomen der PEO-Ketten für Chemisorption an die Partikel sorgen [108, 109]. In stark salzhaltigem Medium wie ZKM verlieren die bürstenartigen PEO-Ketten einen Teil ihres zwischen ihnen gebundenen Wassers und gehen anschließend

stärkere attraktive Wechselwirkungen miteinander ein (Abbildung 38b) [104, 110]. Durch diese Anziehung entstehen Lücken in der bürstenkopfförmigen Oberfläche. Über diese können Proteine, wie z.B. BSA, welches in ZKM das höchst abundante Protein ist, in Richtung des Partikelkerns über eine *side-on* Koordination zwischen die PEO-Ketten gelangen und anschließend eine, gegenüber der van-der-Waals Bindung zum Stabilisator energetisch bevorzugte, kovalente Bindung mittels der S-Atome der Cysteingruppen ausbilden [99].

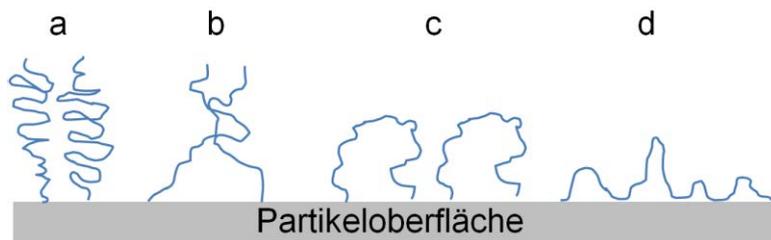


Abbildung 38: Stabilisatorkonfiguration an der Oberfläche von Ag-NP abhängig von ihrer Konzentration. a) bürstenförmig, b) gekreuzt, c) pilzförmig, d) schleifenförmig [94, 111].

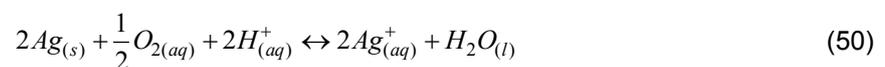
Der Stabilisator PVP bindet ähnlich wie die Detergentien von AgPure über σ -Bindungen der freien Elektronen, in diesem Falle der Elektronen des N-Atoms, an die Partikeloberfläche. Es kommt nachfolgend jedoch nicht zur Ausbildung einer Bürstenstruktur der Polyethylenketten, sondern zu einer schleifenförmigen Anordnung (Abbildung 38d). Dabei steht der heterocyclische Pyrrolidonteil bei entsprechend hoher Stabilisatorkonzentration mit dem N- und O-Atom rechtwinklig zur Partikeloberfläche [112]. Dabei werden die N-Atome vom hydrophoben Rest des PVP eingeschlossen und das O-Atom ist zum polaren Lösungsmittel gewandt [113]. Diese Anordnung war durch den großen Überschuss an PVP bei der Herstellung der Partikel wahrscheinlich. Innerhalb der Schleifenstruktur kommt es zu Wassereinlagerung und damit zu einem Quellen der PVP-Schicht. Damit wird eine Annäherung von Proteinen an die NP-Oberfläche sowohl durch sterische Abstoßung zwischen Polyethylenketten und mit Albumin belegten Proteinen, als auch durch die größere Ausdehnung der elektrochemischen Doppelschicht erschwert. Bei den Nanocomposix Partikeln war trotz der beschriebenen Hemmnisse eine Proteinkorona nachweisbar. Diese war durch sogenannte „weiche Wechselwirkungen“ mit dem Stabilisatormaterial zu erklären. Da Proteine in ihrem natürlichen Zustand eine Ladung tragen, ist ein polares Lösungsmittel, wie z.B. Wasser, für ihre Stabilität favorisiert. Verdrängt das unpolare PVP-backbone einen großen Teil des polaren Lösemittels, so sinkt die freie Energie der Proteinöffnung ΔG_{op}^0 , welches zunächst für eine Offenlegung der unpolaren α -Helices bzw. β -Faltblattstrukturen der Proteine sorgt, die anschließend durch Wechselwirkungen mit dem hydrophoben PVP-backbone reagieren können [114, 115]. Es steht also zu vermuten, dass PVP durch sein sterische Hinderung und den energetisch nicht be-

vorzugten Entfaltungprozess adsorbierender Proteine eine geringere Proteinadsorption bei den Nanocomposix Partikeln im Vergleich zu AgPure hervorruft [23, 46].

Die TEM-Ergebnisse bestätigten die bisherigen Annahmen der Ausbildung einer Proteinkorona um beide Partikelsorten, durch die Akkumulation von Schwefel aus Cysteingruppen der Proteine um die Partikel. Die Proteinadsorption erfolgte bei beiden Partikeln auf unterschiedlichen Wegen. Bei Agpure überwog der Entropiegewinn durch die Freisetzung von Wasser zwischen den PEO-Ketten den Entropieverlust der sich in den neu entstandenen Zwischenräumen anlagernden teilweise entfalteten Proteine. Bei Nanocomposix sorgen die hydrophoben Polyethylenketten für eine Entfaltung der Proteine und eine Adsorption ihrer hydrophoben inneren Strukturen (α -Helices und β -Faltblatt).

5.1.6 Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie und Dialyse

Die Ionenfreisetzung spielt in der Toxizität von Ag-NP eine wichtige Rolle [43, 116]. Diese Freisetzung erfolgt durch die Oxidation elementaren Silbers an der Oberfläche der NP (Gleichung 50). Dabei muss beachtet werden, dass diese Annahme für Systeme ohne weitere reduzierende bzw. oxidierende Bestandteile angenommen wurde. Gondikas et al. konnten zeigen, dass die Anwesenheit von Cystein, welches in ZKM vorhanden ist, die Freisetzung von Silberionen aus PVP-beschichteten NP durch Komplexierung verstärkt [87].



Um die Ionenfreisetzung zu untersuchen, wurden Dispersionen beider NP sowohl in Wasser, einer physiologischen Kochsalzlösung als auch ZKM mit einer jeweiligen Silberkonzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 24 h im Dunkeln dialysiert. Dabei ergaben sich nach ICP-MS Messungen für die einzelnen Dialysate die in Tabelle 4 dargestellten Werte. AgPure zeigte ein sehr geringes Lösungsverhalten in Wasser. Die im Vergleich dazu höhere Ionenfreisetzung von Nanocomposix Partikeln in wässriger Dispersion könnte mit der Oberflächenbelegung durch die Stabilisatoren erklärt werden. Die Stabilisatoren Tween20 und Tagat TO V binden mit dem Sauerstoff des Sorbitol-Rings (Tween20) bzw. über den Sauerstoff der Carbonylgruppe der Ester (Tagat TO V) an die Partikeloberfläche und erzeugen so eine bürstenförmige Anordnung der PEO-Reste. Die hydrophilen Stabilisatoren sorgen somit durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu umgebendem Wasser für eine Art „water cloud“ (Vonarbourg *et al.*), durch den weitere Wassermoleküle daran gehindert werden können, den Silberkern oxidativ anzugreifen [94, 117]. Zum anderen kann die Konzentration freier Silberionen auch durch Hydroxy- und Carbonyl-Gruppen der Stabilisatoren verringert werden, die in der Lage sind,

Ag⁺-Ionen zu binden [118]. Diese polaren Eigenschaften besitzt PVP, der Stabilisator der Nanocomposix Partikel, nicht und führte so zu einer dreifach stärkeren Freisetzung von Silberionen in wässriger Dispersion als bei den AgPure Partikeln (15.0 ± 0.1 % (Nanocomposix) gegen 5.4 ± 0.2 % (AP)). Beide Partikel zeigten auch nach einer Woche unter den in Tabelle 4 angegebenen Versuchsbedingungen keine große Veränderung der Ionenfreisetzung, was auf eine grundsätzlich hohe Partikelstabilität schließen ließ. Wurden die Partikel in ZKM suspendiert, änderten sich sowohl ihre kurzfristigen (24 h) als auch die langfristigen (168 h) Ionenfreisetzungen. Die Silberionen Konzentration von AgPure in ZKM-Dispersion stieg auf 15.1 ± 0.2 % nach 24 h und auf 23.6 ± 0.5 % nach einer Woche. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Ionenfreisetzung in Medium nicht wie in wässriger Dispersion schon nach 24 h beendet war. Nanocomposix zeigte nach 24 h in ZKM-Dispersion nur eine geringe Veränderung der Silberionen Konzentration im Vergleich zu der wässrigen Dispersion. Ebenso fiel der Anstieg nach einer Woche moderater als bei AgPure aus, wobei sich die finalen Konzentrationen beider Partikel glichen. Vor allem das Salz aus dem ZKM hatte Einfluss auf die Ionenfreisetzung der Partikel, wie ein Vergleichsversuch von AgPure in nahezu isotonischer ($6.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ anstatt $9 \mu\text{g mL}^{-1}$) NaCl-Lösung zeigt. Die Konzentration von $6.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ NaCl entsprach der Konzentration in ZKM. AgPure zeigte in diesem Fall eine nahezu identische Ionenfreisetzung wie in ZKM-Dispersion.

Tabelle 4 ICP-MS Ergebnisse der NP-Dialysate (außerhalb der Dialysemembrane). Die Partikel mit einer Silberkonzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ wurden jeweils 24 h bei 37°C im Dunkeln unter Rühren im jeweiligen Dispersionsmedium belassen.

Silber Partikel Sorte (Ag Konzentration: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	Dispersionsmedium	Freigesetzte Silberionen nach:			
		24 h		168 h (1 Woche)	
		Konzentration [$\mu\text{g Ag} / \text{mL}$]	Anteil in % von Ausgangs- konzentration	Konzentration [$\mu\text{g Ag} / \text{mL}$]	Anteil in % von Ausgangs- konzentration
AgPure.	Wasser	1.4 ± 0.1	5.4 ± 0.2	1.5 ± 0.1	5.9 ± 0.2
	ZKM	3.8 ± 0.1	15.1 ± 0.2	5.9 ± 0.2	23.6 ± 0.5
	NaCl ($6.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) – Lösung	$3,7 \pm 0.1$	14.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1	23.4 ± 0.1
Nano composix	Wasser	3.7 ± 0.2	15.0 ± 0.5	3.9 ± 0.1	15.6 ± 0.2
	ZKM	4.3 ± 0.1	16.8 ± 0.4	5.5 ± 0.1	22.0 ± 0.3

Die Bildung von schwerlöslichem AgCl, entweder in nanopartikulärer Form oder als Agglomerat, in chloridhaltigen Lösungen könnte die tatsächliche Silberionen Freisetzung beeinflussen [86]. Ebenso kann die Reduktion des Silbers mittels Glukose aus dem ZKM stattfinden, was aber die ICP-MS Messungen nicht beeinflusst, da die Lösungen vor der Messung mit HNO₃ angesäuert werden und damit dieses Silber als SN wieder in Lösung ginge [119].

Um die Umsetzung von Ag^+ zu AgCl und damit einhergehend mögliche Minderbefunde an Silber zu untersuchen, wurden zusätzlich zum Dialysat auch die ZKM-Dispersionen innerhalb der Dialysemembranen vermessen (Tabelle 5). Nach Addition der Ag-Mengen im Dialysat und innerhalb der Dialysemembran wiesen die Nanocomposix-Dispersionen nach 24 h und nach einer Woche jeweils ca. 2.2 % weniger Silber auf, als in den Stammdispersionen ($25 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$) enthalten war. Bei AgPure kam es zu einer geringen Überbestimmung von Silber sowohl nach 24 h (2.3 %) als auch nach einer Woche (2.1 %). Inklusive der systematischen Messungenauigkeiten beim Herstellen der Dialyседispersionen, die sich laut Angaben des Pipettenherstellers auf $\pm 1.3 \%$ belaufen, lagen die Werte jedoch noch innerhalb der Fehlertoleranz.

Tabelle 5 ICP-MS Ergebnisse der NP-Dispersionen innerhalb der Dialysemembran nach 24 h bei 37°C im Dunkeln und unter Rühren.

Silber Partikel Sorte (Ag Konzentration $25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	Dispersionsmedium	Silber innerhalb der Dialysemembran nach			
		24 h		168 h (1 Woche)	
		Konzentration [$\mu\text{g Ag / mL}$]	% von Ausgangs- konzentration	Konzentration [$\mu\text{g Ag/ mL}$]	% von Ausgangs- konzentration
AgPure	ZKM	21.9 ± 0.2	87.4 ± 0.6	19.6 ± 0.1	78.5 ± 0.2
Nanocomposix	ZKM	20.3 ± 0.2	81.0 ± 0.8	18.9 ± 0.1	75.8 ± 0.4

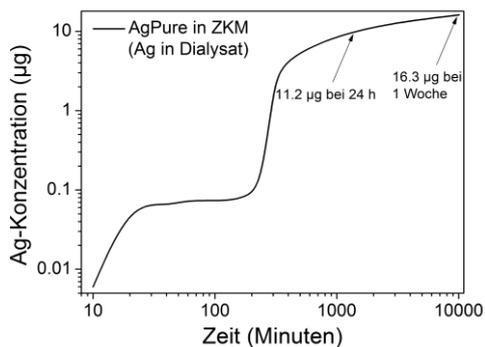
Die stärkere Ionenfreisetzung in ZKM-Dispersion war zum einen auf die Komplexierung von Ag^+ durch Cystein aus dem FKS zurückzuführen, welche das Gleichgewicht in Richtung Ionenfreisetzung verschiebt [87]. Zusätzlich kam es durch die hohe Cl^- Konzentration (120 mM) zur Bildung löslicher Silberkomplexe wie AgCl_2^- oder AgCl_4^{3-} , die das Gleichgewicht ebenfalls in diese Richtung verlagerten, wie es auch bei Liu *et al.* und Huynh *et al.* beschrieben wird [86, 120]. Die Bildung dieser löslichen Komplexe war auch eine Erklärung dafür, dass die Bildung von schwerlöslichem AgCl nicht, oder nur in sehr geringem Maße stattfand. Der schnelle Transport von Ag^+ und Cl^- aus dem Innenvolumen der Dialysemembran in das Dialysat sprach zudem gegen eine Bildung von AgCl innerhalb der Membran bzw. an deren Oberfläche [119]. Um die zellulären Effekte, die von Nanopartikeln ausgehen von denen des freien Silbernitrats besser unterscheiden zu können, wurde eine die Freisetzung von Silberionen in einem weiteren Experiment zeitaufgelöst betrachtet. Dabei war der Versuchsaufbau leicht unterschiedlich gegenüber dem eben beschriebenen. In diesem Fall betrug die Ag-Konzentration innerhalb der Dialysemembran $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ und die Partikel wurden vor der Dispersion in ZKM mit Wasser gewaschen, um nur von den während der Versuchsdauer freigesetzten Ionen ausgehen zu können. Die Ergebnisse dieser Dialyse sind in Abbildung 39 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Partikel erst nach ca. 4 h beginnen, signifikant Ionen freizusetzen. Nach 24 h und einer Freisetzung von 15 % des Silbers in ionischer Form ist

zwar noch nicht das Plateau, und damit der Gleichgewichtszustand, erreicht, aber von dort steigt die Kurve nur noch sehr langsam an. Nach einer Woche sind 16.3 µg (22 %) des Silbers in Lösung. Ab ca. 300 Minuten zeigt sich ein Kurvenverlauf wie bei einer Reaktion erster Ordnung (Gleichung 51), wobei das Lösungsverhalten der Ag-NP nur von ihrer eigenen Konzentration abhängig wäre.

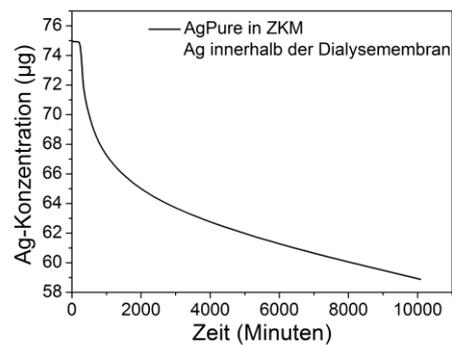
$$\frac{d[A]}{[A]} = -kdt \quad (51)$$

Da im ZKM etliche Bestandteile, vor allem Salze, enthalten sind, die maßgeblichen Anteil am Lösungsverhalten der NP haben (vgl. Tabelle 4) und auch reduzierende Zucker bzw. Stabilisatoren enthalten sind, kann diese Annahme nur stark vereinfacht gelten, was durch die nicht optimal lineare Funktion der Auftragung von $\ln[A]/[A_0]$ gegen die Zeit in Abbildung 39 C zu erkennen ist [121, 122].

A



B



C

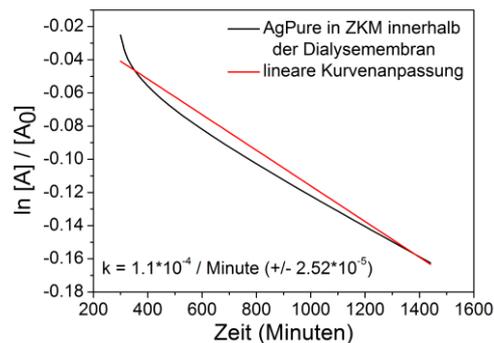


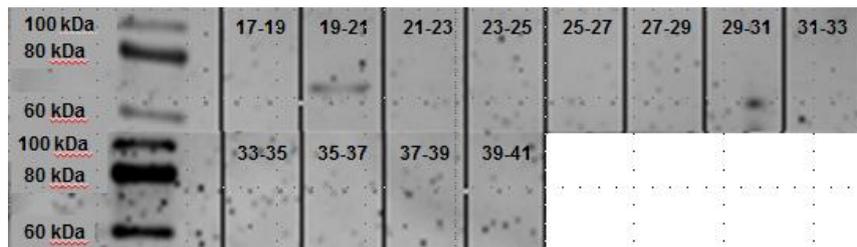
Abbildung 39 Dialyse von 75 µg Ag als AgPure in ZKM gegen 300 mL Wasser. Zeitlicher Verlauf der Silberkonzentration im Dialysat (A) und die daraus errechneten Werte für das Innenvolumen der Dialysemembran (B). Auftragung des \ln des Quotienten aus der Silberkonzentration an einem bestimmten Zeitpunkt ($[A]$) und der ursprünglichen Silberkonzentration von 75 µg ($[A_0]$) gegen die Zeit. Aus der Steigung der Geraden kann direkt die negative Geschwindigkeitskonstante entnommen werden.

Aus der Auftragung des In des Quotienten aus der Ag-Konzentration zu einer bestimmten Zeit [A] und der Ag-Ausgangskonzentration [A₀] gegen die Reaktionszeit konnte die Geschwindigkeitskonstante k aus der Geradensteigung erhalten werden. In diesem Fall betrug $k = 1.1 \times 10^{-4} \text{ Minute}^{-1} (\pm 2.52 \times 10^{-5})$. Dieser relativ hohe Fehler von 22.9 % war auf das nicht ideale Verhalten 1. Ordnung zurückzuführen. Vergleicht man diese Werte mit denen von Kittler *et al.*, die Dialysen von PVP- und Zitrat-beschichteten Ag-NP durchgeführten, fällt auf, dass die Freisetzung innerhalb der ersten 24 h ähnlich verläuft [123]. Bei einer Ag-Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konnten Kittler *et al.* eine Silberfreisetzung von ca. 50 % bei den PVP-beschichteten und ca. 6 % bei den Zitrat-beschichteten bei 37°C feststellen. Im Unterschied zu dieser Arbeit zeigten die AgPure-Partikel jedoch kein so ausgeprägtes Lösungsverhalten nach einer Woche wie die dort untersuchten Partikel. Die Zitrat-beschichteten Partikel hatten nach einer Woche Versuchsdauer bei Kittler *et al.* 50 % ihres Silbers in ionischer Form verloren. Bei den PVP-beschichteten waren es nach 200 h schon über 80 %. Bei beiden Partikeln steigen die Werte nach diesen Zeiten nicht weiter an. AgPure scheint schon früher die Sättigungskonzentration zu erreichen, da zwischen 24 h und einer Woche nur noch ein sehr geringer Anstieg der Werte stattfindet. Auch die Freisetzung in den ersten 200 Minuten ist unterschiedlich von denen bei Kittler *et al.*, da beide Partikel dort nahezu sofort mit der Freisetzung von Silberionen beginnen. Die verzögerte Freisetzung bei AgPure in ZKM kann auf die reduzierende Wirkung der PEG-Ketten der Stabilisatoren sowie die reduzierende Wirkung der Glukose aus dem ZKM zurückgeführt werden, die anfänglich entstehende Silberionen in Ag⁰ umwandeln. Die Dispersion innerhalb der Dialysemembran wurde nicht untersucht, so dass dieser Faktor nicht in die Berechnung aufgenommen werden konnte. Vergleicht man jedoch die prozentualen Silberionen Freisetzungen der zeitaufgelösten Dialyse mit der vorhergehenden (vgl. Tabelle 4 und 5), kann eine starke Übereinstimmung beobachtet werden, was gegen den Verlust durch Ag⁰-Bildung spricht.

5.1.7 Ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese sowie MALDI-MS-MS

Nachdem die bisherigen Analysemethoden schon Hinweise auf eine vorliegende Proteinkorona um beide Partikel lieferten, wurden mit den A4F-Fractionen von Minute 17-41 (AgPure) und 19-39 (Nanocomposix), 1-DE-Experimente durchgeführt (Abbildung 40). Durch diese sollten Fractionen mit Proteinkorona identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass AgPure nur in der Fraction von Minute 19-21 ausreichend Proteine für eine weitere massenspektrometrische Untersuchung enthielt. Nanocomposix wies in mehreren Fractionen auswertbare Proteinbanden auf (Minuten 19-21, 21-23, 23-25, 35-37 und 37-39). Die Fractionen 19-21 von AgPure und 23-25 von Nanocomposix wurden für die MALDI-MS-MS Auswertung genutzt, da diese die höchsten Konzentrationen an Proteinen aufwiesen.

A



B



Abbildung 40: 1-DE Gel-Ausschnitt nach UV-Belichtung der A4F-Fractionen von Minute 17-41 (jeweils 2 Minuten bei einem Detektorfluss von 0.5 mL min^{-1} gesammelt) von AgPure (A) und Nanocomposix (B) jeweils in ZKM. Die Banden an der linken Gelseite stammen vom Proteinmarker. Zu erkennen ist für AgPure bei Minute 19-21 eine schmale Proteinbande, die für alle Fractionen einzigartig ist. Schwarze Färbungen in weiteren Fractionen konnten nicht als Proteine identifiziert werden und sind Farbstoffagglomeraten geschuldet. Nanocomposix Partikel weisen in mehreren Fractionen Proteinbanden auf, die jedoch nahezu identische Strukturen aufweisen.

Die Nanocomposix Partikel enthielten zwar mehr als eine signifikante Bande, jedoch waren in der Bande von Minute 23-25 alle Unterbanden der anderen Fractionen enthalten. Die sichtbaren Banden von AgPure und Nanocomposix befanden sich im Proteinmassenbereich von 60-80 kDa (AgPure) und 45-80 kDa (Nanocomposix). Für die Auswertung wurden jedoch auch höhere und tiefere Massenbereiche aus dem Gel entnommen. Bei beiden Partikeln ergab die MS-Auswertung nur das Protein BSA. Da aber vor allem die 1-DE-Daten der Nanocomposix Partikel mehr als ein Protein in der Korona vermuten ließen, wurden zusätzlich sensitivere zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)-Experimente mit den gleichen A4F-Fractionen durchgeführt (Abbildung 41 A und B). Beide Partikel wiesen vor allem Proteine im pH-Bereich von 5-7 auf, wobei drei gemeinsame Proteine ermittelt wurden (BSA, Protein S100A und Serpin B6). Die Ausdehnung einiger Spots über einen breiteren pH-Bereich war zum einen auf unterschiedlich oxidierte Formen desselben Proteins und/ oder auf den Einfluss von CO_2 zurückzuführen. Die rot markierte Bande 1 wurde durch BSA verursacht und war nach Auswertung der Pixelintensität das Protein mit der höchsten Konzentration. AgPure zeigt insgesamt mehr Banden, was ausgehend von den 1-DE-Daten nicht zu erwarten war und die höhere Empfindlichkeit der 2-DE Versuche unterstrich.

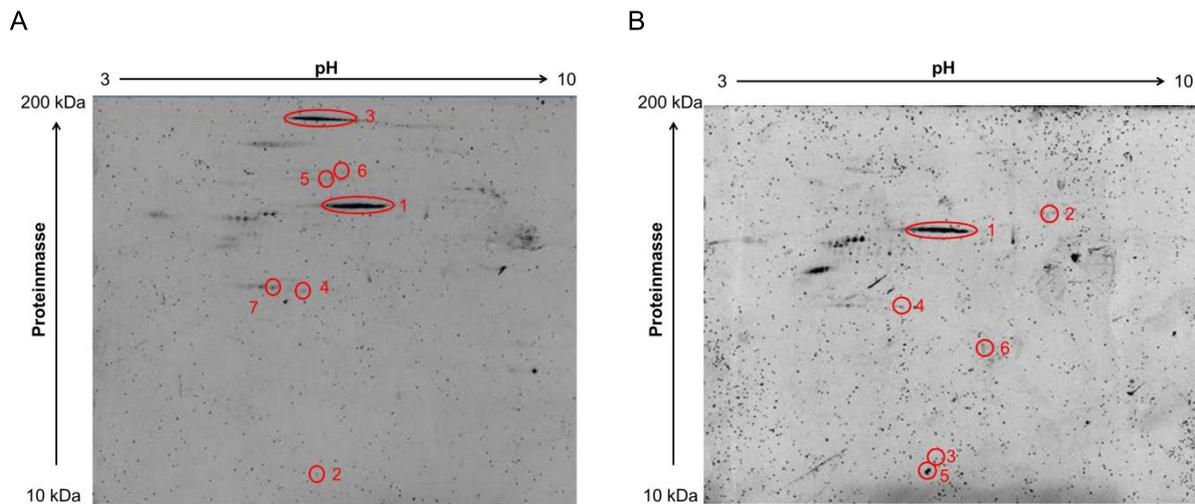


Abbildung 41: 2-DE-Gel Ausschnitte der A4F Fraktionen von Minute 19-21 von AgPure (A) und Minute 21-23 von Nanocomposix (B) jeweils in ZKM. Von beiden Fraktionen wurden fünf Elutionen addiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand vor der Gelvorbereitung entfernt. Rot markiert sind die Proteinspots, die mittels MALDI-Analytik identifiziert werden konnten. Diese Proteine sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Die Liste aller mittels MALDI-MS-MS Analytik nachgewiesenen Proteine für AgPure und Nanocomposix sind in Tabelle 6, bzw. Tabelle 7 ersichtlich. Dabei sind die von der Proteinidentifikationssoftware Mascot erhaltenen Ergebnisse aufgelistet, wobei die Proteine auf dem Gel als Isoformen vorliegen können [124].

Tabelle 6 Proteinidentifikation mittels Maldi-MS-MS nach 2D-Gelelektrophorese von AgPure-Partikeln nach 24 h in ZKM und anschließender Aufreinigung durch die A4F.

Protein	MW (kDa)	Mowse score	Funktion des Proteins	Swissprot ID	Peptid-übereinstimmung (%)
Serum Albumin (1)	69.293	191	Metallionenbindung	P02769	26
Protein S100 A4 (2)	11.807	48	Kalziumbindung	P35466	34
KIF 15 (3)	160.272	58	ATP-Bindung	E1BC41	15
Actin (4)	42.108	124	Zellstruktur	P60712	38
ERC-2 (5)	79.171	57	Zell-Zell Interaktion	A6QNV7	28
Transferrin (6)	77.753	46	Ionen-transport	Q29443	21
Serpin B6 (7)	42561	45	Proteaseinhibitor	O02739	17

Bei beiden Tabellen fällt die insgesamt hohe Zahl (fünf von 11) an metallionenassoziierten Proteinen ins Auge. Dennoch handelte es sich nicht wie bei Bouwmeester *et al.* um Metalllothioneine, obwohl das gleiche Zellsystem und ebenfalls Nanocomposix-Partikel eingesetzt wurden [32]. Dies hing wahrscheinlich mit der kürzeren Expositionsdauer von 4 h bei Bouwmeester zusammen, da die Ausbildung einer Proteinkorona unterschiedliche Stadien durchläuft [42].

Tabelle 7 Proteinidentifikation mittels Maldi-MS-MS nach 2D-Gelelektrophorese von Nanocomposix-Partikeln nach 24 h in ZKM und anschließender Aufreinigung durch die A4F.

Protein	MW (kDa)	Mowse Score	Funktion des Proteins	Swissprot ID	Peptid-übereinstimmung (%)
Serum Albumin (1)	69.293	130	Metallionenbindung	P02769	26
5 Aminolevulinat synthase (2)	71.986	40	Phosphatbindung	A6QLI6	10
Myotrophin (3)	12.895	22	Zellwachstum	Q3T0F7	17
Serpin B6 (4)	42.561	40	Proteaseinhibitor	O02739	14
Protein S100-A2 (5)	10.893	46	Kalziumbindung	P10462	33
Arylacetyl-CoA N-acyltransferase (6)	33.947	47	Transferase	O77512	10

BSA war das Protein mit der höchsten Konzentration auf den Partikeln. Durch Vergleich der Spotintensitäten konnte ein Verhältnis von Albumin zu der Summe aller weiteren detektierten Proteine von 1,6 zu 1 (AgPure) und 3,4 zu 1 (Nanocomposix) festgestellt werden. Beiden Partikeln gemeinsam waren die Proteine Serpin B6 und jeweils ein Protein der S100-A Gruppe. Auch nach 24 h Exposition in ZKM ist Albumin das am höchsten abundante Protein, was im Gegensatz zu anderen Publikationen zu diesem Thema steht [37, 125]. Es wird vermutet, dass Albumin, aufgrund seiner Abundanz in ZKM, als erstes an die Partikel bindet, später jedoch durch andere Proteine mit einer langsameren Bindungskinetik aber höheren Bindungsstärken ausgetauscht werden [126]. Im Gegensatz dazu zeigten Gessner *et al.*, dass an hydrophile Oberflächen, welche die Stabilisatoren von sowohl AgPure als auch Nanocomposix repräsentieren, vor allem Serum Albumin, Immunoglobulin und Fibrinogen adsorbieren [108], von denen auf den in dieser Arbeit untersuchten Partikeln jedoch nur Albumin gefunden werden konnte. Die Arbeiten von Shannahan *et al.* und Maiorano *et al.*, die die NP-Korona nach Inkubation in ZKM beschreiben, zeigen Übereinstimmungen mit weiteren Proteinen, i.e. Proteine der S-100 Gruppe sowie Serpin B3 und Transferrin [41, 127]. Maiorano *et al.* verwendeten im Gegensatz zu dieser Arbeit jedoch Gold-NP und Shannahan

et al. setzten die NP nur für 1 h dem ZKM aus. Eine solch kurze Inkubation führt allein durch den Faktor Zeit zu einer anderen Korona als eine 24 h Inkubation, die in dieser Arbeit untersucht wurde [125]. Unter den identifizierten Proteinen bei AgPure und Nanocomposix fanden sich mehrere Metallionentransporter. Der hydrodynamische Ionenradius von Kalzium (ca. 600 pm) und Silber (250 pm) ermöglicht es Silberionen in die Kalziumtaschen der Metallionentransporter zu gelangen und dort möglicherweise an Thiolgruppen zu binden [128]. Da Transportproteine häufig nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip funktionieren ist ein Austausch von Kalzium zu Silber aufgrund der vergleichbaren Radien also denkbar.

Generell war die Proteinkorona beider Partikel durch die hohe Konzentration von Serum Albumin, der Übereinstimmung von Serpin B6, Protein S100-A und nur geringen anderen Anteilen relativ ähnlich. Die sterische Abschirmung von BSA trug zur geringeren Polydispersität der Nanocomposix Partikel in ZKM verglichen mit A4F Eluent bei. BSA als Hauptprotein der Korona und seine sterische sowie Coulombsche Abschirmung kann auch als eine Erklärung für die Hinderung der Aufnahme von AgPure in Caco-2 Zellen in einer Arbeit von Böhmert *et al.* gesehen werden [46, 129].

5.1.8 Vergleich der Koronae nach Asymmetrischer Fluss Feldflussfraktionierung und Zentrifugation

In dieser Arbeit wurde die A4F zur Größentrennung und Separation der NP von freien Proteinen angewandt. In etlichen Publikationen wird hierfür die Ultrazentrifugation verwendet, welche aber zu Akkumulation von ungebundenen Proteinen führen kann [126, 130]. Nach der Zentrifugation können in dem entstandenen NP-Proteinpellet Agglomerate aus NP und Proteinen entstehen, die auch durch wiederholtes Waschen nicht entfernt werden können. Zudem erhöhen vielfache Waschschrte die Möglichkeit der Modifikation der Korona, die ohne die Behandlung wahrscheinlich nicht erfolgen würde. Aus diesem Grund wurden, wie im Punkt Zentrifugation beschrieben, 2-DE-Gele von NP-ZKM Dispersionen angefertigt, die den Ag-Konzentrationen der A4F-Versuche entsprachen. Die Gele der zentrifugierten Dispersionen zeigten sowohl eine wesentlich höhere Konzentration an Proteinen, was sich in den breiteren Spots erkennen lässt, als auch wesentlich mehr Spots, was auf zusätzliche Proteine schließen ließ (Abbildung 42).

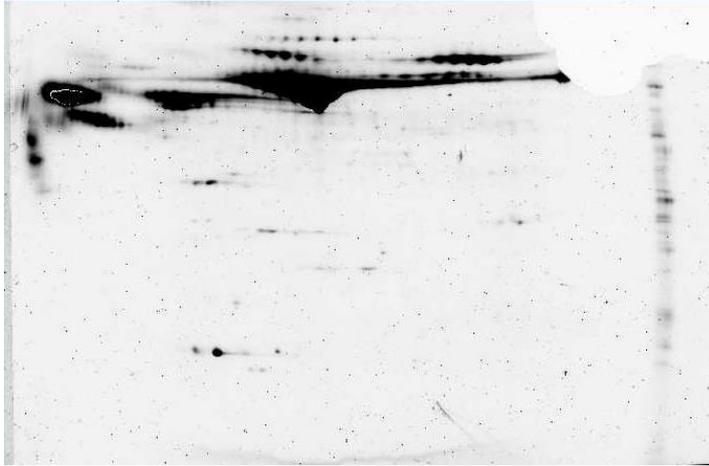


Abbildung 42: 2-DE-Gel von einer AgPure ZKM-Dispersion (500 $\mu\text{g Ag mL}^{-1}$) nach dreimaliger Zentrifugation bei 2000 x g für 20 min und Waschen mit PBS nach jedem Zentrifugationsschritt.

Auf eine qualitative Auswertung der Proteine wurde verzichtet, da eine erhöhte Spotzahl in Bezug auf die Gele in Abbildung 41 ausreichend war.

5.1.9 Oberflächenbelegung der Nanopartikel

Um die Anzahl der Proteinmoleküle an der Oberfläche der Partikel abzuschätzen, wurden bestimmte Gegebenheiten vorausgesetzt. Da Serum Albumin das höchst abundante Protein in beiden Partikelkoronae ist, wurde modellhaft von einer reinen Albuminkorona ausgegangen. Die Maße des Proteins wurden aus den Annahmen von He *et al.* und Ferrer *et al.* übernommen, wobei Serum Albumin in einer Umgebung mit einem pH-Wert von 7 die Form eines gleichseitigen Dreiecks mit einer Seitenlänge von 8 nm und einer Tiefe von 3 nm aufweist [91, 131]. Der pH-Wert der Partikeldispersion im ZKM betrug 7.4 und nach der A4F Trennung 6.6. Zunächst wurde das von den Proteinen maximal eingenommene Volumen V_{max} um die Partikel ermittelt.

$$V_{\text{max}} = \frac{4}{3} \pi (R_{H,PMP} - R_{H,POP})^3 \quad (52)$$

$R_{H,PMP}$ und $R_{H,POP}$ sind die mittleren intensitätsgewichteten R_H der Partikel mit bzw. ohne Proteinkorona. Für AgPure ergab sich ein Volumen von 84714.15 nm³ und für Nanocomposix von 421758 nm³. Die Masse der Gesamtproteine, in denen die Partikel vor der A4F-Trennung suspendiert wurden, betrug 2.12 mg. Zur Berechnung des Albumingehaltes wurden die Angaben des Herstellers des ZKM genutzt (ca. 85 % Albuminanteil an Gesamtprotein).

Bei einer Molekülmasse von 69.293 kDa für Serum Albumin ergab sich die Anzahl der maximal zur Verfügung stehenden Albumin-Moleküle zu:

$$\frac{2.12mg}{66293000mg} * N_A = 1.93 * 10^{16} \text{ Moleküle BSA} \quad (53)$$

Zur weiteren Berechnung wurde mit den Integralen der UV-Absorptionen der A4F-Trennung gearbeitet. Zunächst wurden die Integrale der Signale der gesamten verfügbaren Proteine, die in der Injektion von 100 µL einer ZKM-NP Dispersion enthalten sind, gemessen. Dann wurden bei den Elugrammen der NP-ZKM Dispersionen die Integrale der Peaks bei der gleichen Retentionszeit gebildet, und von den Integralen der gesamten freien Proteine abgezogen. Die sich ergebende Differenz entsprach der Menge an Protein, die als Korona um die NP verteilt waren. Aus den Daten ergab sich, dass auf den AgPure-Partikeln eine Proteinmasse von 0.101 mg ($\equiv 2 * 10^{-9}$ mol Albumin) adsorbiert wurde und bei den Nanocomposix Partikeln eine Masse von 0.09 mg ($\equiv 1 * 10^{-9}$ mol). Es wurden jeweils 100 µL einer NP-Dispersion mit einer Gesamtsilberkonzentration von 500 µg mL⁻¹ und damit jeweils 50 µg Silber in die A4F injiziert. Mit Hilfe der SAXS-Ergebnisse für die Partikelkernradien und der Dichte von Silber ergeben sich die Gesamtpartikelanzahl in der injizierten AgPure Dispersion zu $3.7 * 10^{12}$ (AgPure) und $1.32 * 10^{12}$ (Nanocomposix). Für die AgPure-Partikel ergab sich daraus zusammen mit dem Volumen der Proteinkorona eine maximale Belegung mit ca. 769 Albumin-Molekülen und für Nanocomposix eine von ca. 4744. Die Masse tatsächlich adsorbierten Albumins zeigte, dass AgPure mit maximal 248 und Nanocomposix mit 612 Albuminmolekülen belegt sein kann, was bei AgPure etwa 33 % und bei Nanocomposix etwa 13 % bedeutet. Diese Annahmen sahen jedoch weder bestimmte Molekülanordnungen vor, noch berücksichtigten sie interpartikuläre Wechselwirkungen.

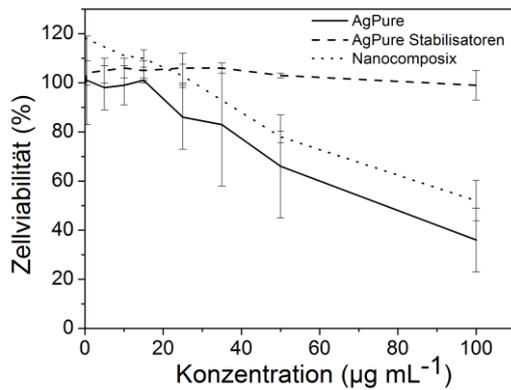
Eine Schlussfolgerung dieser Ergebnisse war, dass die Moleküle in der AgPure-Korona dichter gepackt vorliegen können, da die Proteinmasse auf beiden Partikeln relativ identisch war. Dieses Ergebnis ist aufgrund der Struktur der Stabilisatoren der beiden Partikel zu erwarten, da PVP eine viel stärkere Verflechtung der Polyethylenketten aufweist, was zu unzugänglichen Hohlräumen und damit mehr ungenutzter Adsorptionsfläche führt als bei den Strukturen an der Oberfläche von AgPure (siehe Kapitel 5.1.5).

5.2 Proteomik

Bei der oralen Aufnahme von NP gelangen diese nach der Passage des Mundes, der Speiseröhre und des Magens in den Dünndarm. In diesem erfolgt die Resorption der in der Nahrung enthaltenen Nährstoffe über die Darmwand. Diese Barriere wurde mittels differenzierter humaner Caco-2 Zellen mit einigen Einschränkungen (siehe Kapitel 3.4) simuliert und die Veränderung des Proteoms der Zellen nach Exposition mit NP bzw. SN analysiert. Dazu wurde die Anzahl deregulierter Proteine ermittelt und ihre möglichen Auswirkungen auf zelluläre Prozesse mittels Ingenuity® Pathway Analyse ausgewertet.

Bei der Interpretation der proteomischen Daten muss zunächst auf die Bestimmung der Silberionenfreisetzung der NP hingewiesen werden (siehe Kapitel 5.1.6), da den Ionen eine wesentliche Rolle in der von NP ausgehenden Toxizität zugesprochen wird [32, 43, 123]. Die vorliegende Arbeit zeigte eine vom Medium abhängige Freisetzung der Ionen, welche in Kontrast zur Arbeit von Stebounova *et al.* stand [132], die keinen signifikanten Einfluss des Mediums beschreibt. Der Anteil der aus den NP freigesetzten Silberionen binnen 24 h in ZKM war vergleichbar mit den in den Zellkulturexperimenten eingesetzten Silberkonzentrationen der SN-Lösungen ($3.8 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ für AP25 bezogen auf $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ SN und $0.38 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ für AP2.5 bezogen auf $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ für SN0.5). Zusätzlich wiesen die NP einen vergrößerten R_H bei unverändertem Partikelkerndurchmesser auf, was durch TEM-Aufnahmen, EDX und 2-DE Experimente mit der Ausbildung einer Proteinkorona erklärt werden konnte [38]. Dementsprechend kamen die Caco-2 Zellen nicht nur mit den Oberflächenstabilisatoren der vergrößerten NP, sondern auch mit einer Proteinschicht in Kontakt, deren Bestandteile wahrscheinlich eine Konformationsänderung durch die Adsorption an die NP erfahren haben [82]. Die Behandlung der Zellen fand nur mit AgPure-NP statt, da die Nanocomposix Partikel erst im Nachhinein angeschafft wurden, um die physikalisch-chemischen Charakteristika zweier Partikel mit gleichem Kernmaterial und ähnlichem Kernradius zu vergleichen. Die in den Zellkulturexperimenten eingesetzten Konzentrationen beider Partikel wurden vor den Zellkulturexperimenten den Ergebnissen von Böhmert *et al.* entnommen [35]. Ausgehend von dieser Studie, in der ebenfalls AgPure und Nanocomposix Partikel eingesetzt wurden, konnten die relevanten Konzentrationsgrenzen auf $0.5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ und $5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ für SN und $2.5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ sowie $25 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ für AgPure ermittelt werden (siehe Abbildung 43). Bei den genannten Konzentrationen zeigte sich bei der geringen Konzentration noch keine signifikante Verringerung der Zellviabilität und bei den hohen Konzentration ein maximaler Abfall auf 80 %. Die Behandlung der Zellen mit dem Stabilisatormaterial der NP zeigte bei keiner untersuchten Konzentration Einschränkungen der Zellviabilität.

A



B

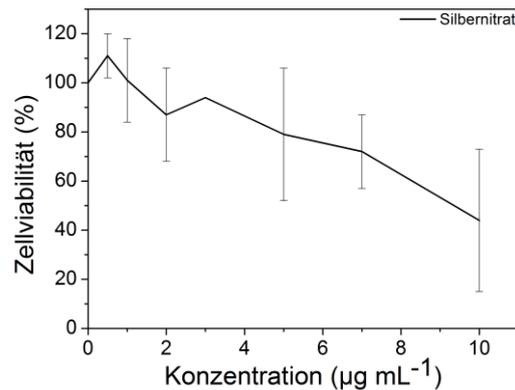


Abbildung 43: Bestimmung der Konzentrationen beider Nanopartikelspezies, ab denen Zytotoxizität eintritt (Zellviabilität < 80%). (A) Für AgPure liegt diese Grenzen etwa bei $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (durchgezogene und gepunktete Linie). Die Stabilisatoren von AgPure zeigen ebenso wie das PVP der Nanocomposit Partikel keine Beeinflussung der Zellen. Nur die Ergebnisse der AgPure-Stabilisatoren sind hier gezeigt (gestrichelte Linie). (B) Verhältnis der Zellviabilität zur SN Konzentration. Zytotoxizität setzt hier bei etwa $5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ ein [35].

Nachdem die Zellen, wie in Kapitel 4.10 beschrieben, behandelt wurden, konnten mit ihren Lysaten 2-DE Experimente durchgeführt werden (Abbildung 44) und die Proteinderegulation anhand ihrer Spotintensitäten auf den Gelen berechnet werden. Eine vertikale Verschmierung der Spots entstand durch posttranslationale Modifikationen der Proteine, eine horizontale durch unterschiedliche Oxidationsstufen des Proteins bzw. unregelmäßigen Stromfluss während der Elektrophorese. Diese Abweichungen wurden bei der Spotintensitätsberechnung durch die Bildbearbeitungssoftware einbezogen. Deregulierte Proteine wurden anschließend mit Hilfe eines MALDI-MS-MS Massenspektrometers qualitativ ausgewertet.

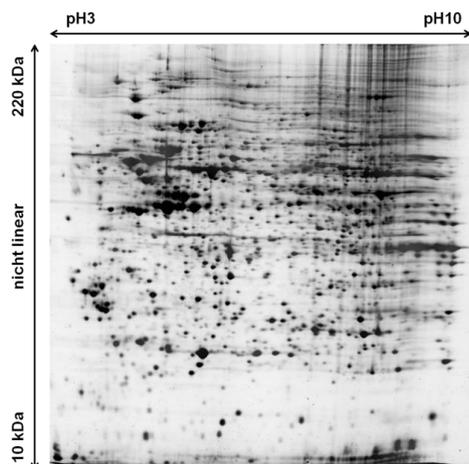


Abbildung 44: Beispiel eines 2D-Polyacrylamidgels aus dem Zellysate mit AgPure behandelte Caco-2 Zellen. Jeder schwarze Punkt auf dem Gel ist einem Protein zugehörig. Eine Verschmierung der Spots in vertikaler Richtung kann durch verschiedene posttranslationale Modifikationen entstehen, eine horizontale durch unterschiedliche Oxidationsstufen eines Proteins, bzw. Unregelmäßigkeiten im Stromfluss während der Elektrophorese. Zusätzlich können Farbstoffagglomerate und eine nicht vollkommen korrekt gewählte Fokussierungsdauer während der Elektrophorese dazu beitragen.

Bei der Auswertung der Gelspots der verschiedenen Behandlungsgruppen mittels der Bioinformatiksoftware Delta2D™ und ProteinMine wurden signifikante Unterschiede der deregulierten Proteine sowohl zwischen den Silberbehandlungsgruppen (AgPure, SN) als auch zwischen den jeweiligen Konzentrationen (25 µg mL⁻¹, 2.5 µg mL⁻¹ für AgPure bzw. 5 µg mL⁻¹, 0.5 µg mL⁻¹ für SN) festgestellt. Diese Unterschiede waren in den NP-Behandlungsgruppen ausgeprägter als bei SN, da die NP-Gruppen die meisten deregulierten Proteine enthielten. Abbildung 45 zeigt die Anzahl der deregulierten Proteine, die einen FC von ≥ 1.4 für die hochregulierten bzw. ≤ -1.4 für die herunterregulierten Proteine aufweisen.

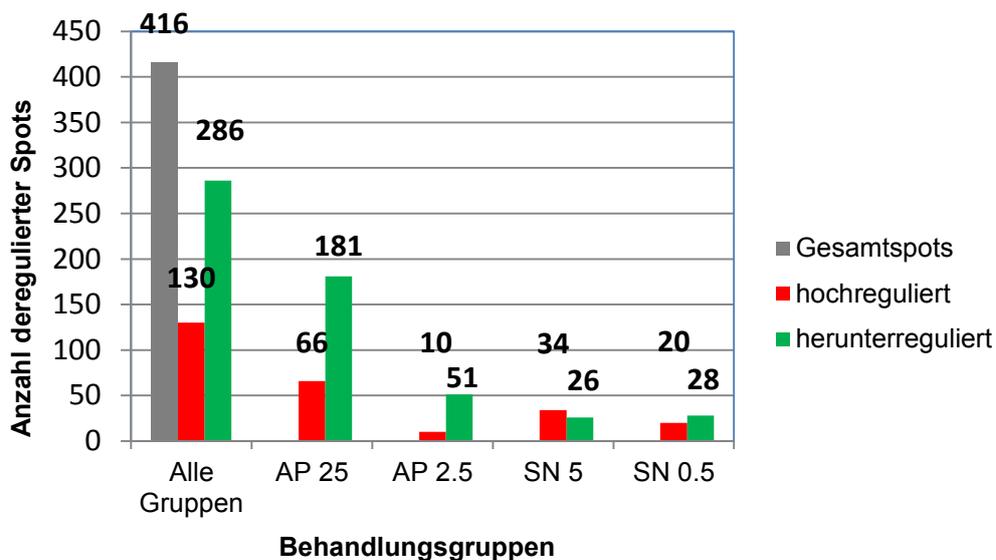


Abbildung 45: Visualisierung der deregulierten Proteinspots der verschiedenen Behandlungsgruppen. Es wurden nur Proteine gezählt, deren FC ≥1.4 bzw. ≤ -1.4 war. Über alle Behandlungsgruppen waren 416 Proteine dereguliert, davon 130 hoch- und 286 herunterreguliert. AP25 wies 66, AP2.5 10, SN5 34 und SN0.5 20 hochregulierte Proteine auf. Bei den gleichen Gruppen waren 181, 51, 26 sowie 28 Proteine herunterreguliert.

Bemerkenswerterweise wiesen die NP-Behandlungsgruppen mehr als dreimal so viele deregulierte Proteine auf wie die SN-Gruppen (308 bei den NP zu 108 bei SN). Diese Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen stehen im Gegensatz zu der Arbeit von Bouwmeester *et al.*, die nach 4 h Exposition von Caco-2 Zellen mit Ag-NP und SN keine signifikanten Unterschiede der Anzahl deregulierter Proteine je Behandlungsgruppe feststellen konnten [32]. Auch die in der beschriebenen Arbeit gefundene Gruppe der am stärksten deregulierten Proteine, i.e. Metallothioneine, konnten in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Ein Grund für diese Unterschiede ist in der unterschiedlichen Inkubationszeit der Zellen zu suchen (4 h bei Bouwmeester *et al.* zu 24 h in dieser Arbeit).

Die höheren Konzentrationen der Behandlungsgruppen (AP25 und SN5) zeigten auch stärkere Auswirkungen auf die Anzahl deregulierter Proteine. Die NP-Behandlungsgruppen wiesen zudem wesentlich mehr herunterregulierte als hochregulierte Proteine auf, während dieser Unterschied bei den SN-Gruppen nicht so stark ausgeprägt war. Von den 286 herunterregulierten und 130 hochregulierten Proteinen konnte nur etwa die Hälfte massenspektrometrisch ausgewertet werden (Abbildung 46). Dies lag zum einen daran, dass die Empfindlichkeit der Kamera des Spotpickers nicht so hoch war, wie diejenige der Kamera, die zur Auswertung der Spotintensitäten genutzt wurde und somit zuvor klar identifizierte Spots nicht ausgeschnitten werden konnten. Zum anderen konnten einige Spots bei der MALDI-Analytik nicht eindeutig einem Protein zugeordnet werden (Mowse-Score zu gering oder falsche Spezies).

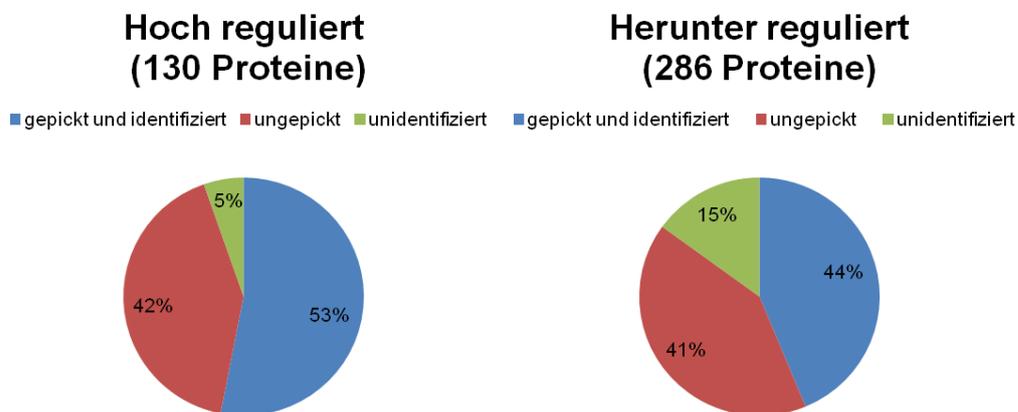


Abbildung 46: Übersicht der mittels Delta 2D-Software identifizierten Proteine mit einem fold change von ≥ 1.4 bzw. ≤ -1.4 und deren prozentuale Wiederfindung im Spotpicker (blaue und grüne Bereiche) sowie der endgültig massenspektrometrisch identifizierten Proteine (blaue Bereiche). Rote Bereiche kennzeichnen Spots, die nicht im Spotpicker wiedergefunden werden konnten.

Nach der MALDI-MS-MS Auswertung wurden die Proteine der einzelnen Behandlungsgruppen mittels Venn-Diagramm eingeteilt (Abbildung 47).

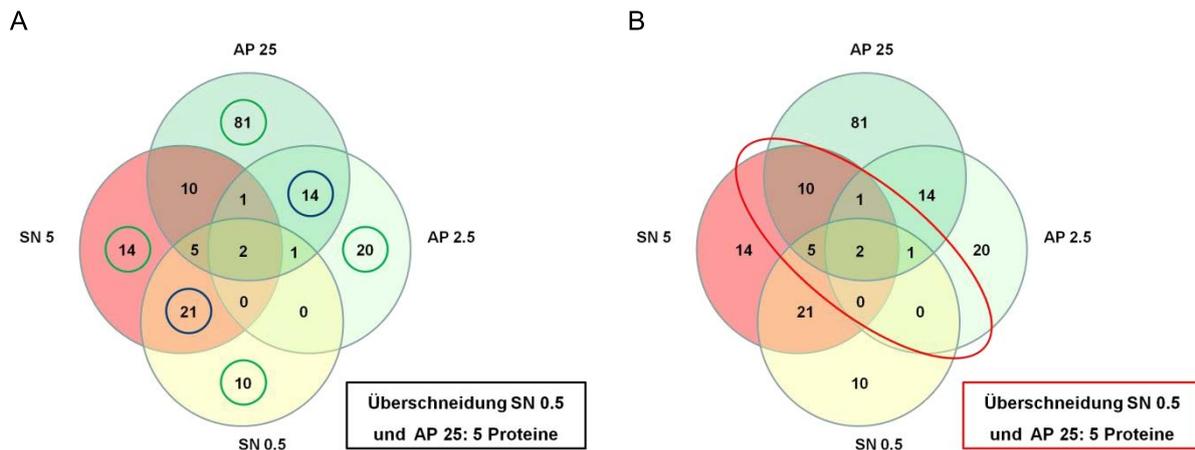


Abbildung 47: Venn-Diagramm der in Abbildung 46 als „gepickt und identifiziert“ gekennzeichneten Proteine aller Behandlungsgruppen und deren Überlappungen. (A) Gesamtübersicht, grün markiert sind Proteine, die behandlungsgruppenspezifisch dereguliert wurden, blau solche, die Überschneidungen innerhalb ihrer Behandlungsgruppe aufweisen. (B) Kennzeichnung der „unspezifisch“ deregulierten Proteine, die sowohl in einer AP als auch einer SN Gruppe dereguliert wurden (rote Umrandungen).

Die SN-Gruppen besitzen weniger behandlungsgruppenspezifische Proteine im Vergleich zu den NP-Gruppen (14 und 10 bei den SN-Gruppen zu 81 und 20 bei den NP-Gruppen, Abbildung 47 A). Die SN-Gruppen zeigen eine stärkere Überlappung von Proteinen der hoch dosierten und niedrig dosierten Behandlungsgruppe als die NP-Gruppen (21 Proteine bei SN gegen 14 bei den NP, Abbildung 47 A). Die Überlappung von Proteinen, die sowohl in NP-Gruppen dereguliert sind, als auch in SN-Gruppen ist im Vergleich zu den gruppeninternen Übereinstimmungen eher gering. Es gibt insgesamt 24 Proteine die mindestens von einer SN- als auch einer NP-Gruppe dereguliert wurden im Gegensatz zu 115 Proteinen, die durch NP-Behandlung bzw. 45, die durch SN-Behandlung dereguliert wurden (Abbildung 47 B). Etwa 50 % der gesamten deregulierten Proteine gehören behandlungsgruppenübergreifend zur Klasse der Enzyme, aber die Identitäten der Proteine der einzelnen Gruppen unterscheiden sich dennoch signifikant voneinander (Tabelle 10-12). Diese Beobachtungen lassen eine erste Vermutung auf unterschiedliche molekulare Effekte durch NP-Behandlung und SN-Behandlung zu.

5.2.1 Ingenuity Pathway Analyse

Um Einblicke in die veränderten biologischen Mechanismen nach NP-Behandlung zu erlangen, wurde mittels IPA eine Auswertung der deregulierten Proteine durchgeführt. Diese führte zu einem Vergleich der von IPA prognostizierten biologischen Prozesse und bestimmter Signaltransduktionswege in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe. Bei einer ausreichenden Übereinstimmung von experimentell ermittelten Proteinen und den Proteinen der jeweiligen

Signaltransduktionswege berechnet IPA deren Aktivierung bzw. Inhibierung anhand der vorhandenen experimentellen Proteinderegulation. Die Interpretation der Signaltransduktionswege bzw. ihrer Aktivierung oder Inhibierung erfolgt in den kommenden Kapiteln. Zusätzlich zu den Signaltransduktionswegen und zellulären Prozessen schlägt IPA auch Netzwerke aus Proteinen vor, die untereinander eine Beziehung aufweisen und entweder direkt oder indirekt über von IPA ermittelte Verbindungsproteine verknüpft sind. Diese Netzwerke können dann von IPA, aufgrund übergeordneter Proteinfunktionen, bestimmten biologischen Prozessen (wie z.B. Fettstoffwechsel, Krebs etc.) zugeordnet werden (siehe Tabelle 8). Die Güte dieser Netzwerke wird durch ihren Score wiedergegeben (siehe Kapitel 4.14). Die Auswertung der Netzwerke der hier vorliegenden Daten zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf spezifische biologische Prozesse. Beide niedrig dosierten Gruppen zeigten einen Einfluss auf die Zellproliferation, während die hoch dosierten Gruppen veränderte Funktionen in Verbindung mit der Zellviabilität aufwiesen. Diese vorhergesagten Funktionen können aktiviert oder inhibiert sein, was sich erst aus der Betrachtung der Deregulation der einzelnen involvierten Proteine ergibt.

Tabelle 8 Von IPA erzeugte Proteinnetzwerke und ihre zugeordneten biologischen Funktionen für die jeweiligen Behandlungsgruppen. Gezeigt werden in diesem Fall jeweils nur die beiden Netzwerke mit dem höchsten Score, da diese zur weiteren Datenauswertung herangezogen wurden. Das jeweils erste Netzwerk jeder Behandlungsgruppe ist in Abbildung 48 bis Abbildung 51 dargestellt.

Behandlungsgruppe	Score	Netzwerkfunktionen
AP2.5	26 (dargestellt in Abb. 48)	Digestive System Development and Function, Gastrointestinal Disease, Hepatic System Development and Function
	21	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Embryonic Development
AP25	32 (dargestellt in Abb. 49)	Post-Translational Modification, Protein Folding, Cell Morphology
	25	Cell Death and Survival
SN0.5	28 (dargestellt in Abb. 50)	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Cancer
	18	Inflammatory Response, Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance
SN5	21 (dargestellt in Abb. 51)	Cell Death and Survival, Post-Translational Modification, Protein Folding
	21	Protein Synthesis, Cell Death and Survival, Dermatological Diseases and Conditions

IPA ermittelt zudem Transkriptionsregulatoren, in IPA *Upstream Regulators* (UR) genannt, und ihre vermutete Aktivierung bzw. Inhibierung auf Basis der experimentell gefundenen deregulierten Proteine. In dem vorliegenden Proteindatensatz konnte kein signifikant ($-2 \leq z\text{-score} \leq +2$) induzierter UR ermittelt werden. Nur der Transkriptionsregulator *Cellular Tumor Antigen p53* (TP53) war bei AP2.5 leicht inhibiert vorhergesagt, jedoch nur mit einem z-score von 0.5. IPA prognostiziert weitere URs, die nicht signifikant induziert wurden, jedoch in die in Tabelle 8 aufgelisteten Netzwerkfunktionen eingeordnet werden konnten. Unter Einbeziehung dieser URs zeigen sich weitere Unterschiede zwischen NP- und SN-Gruppen. So ist der Glukokortikoidrezeptor *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1* (NR3C1) bei beiden NP-Gruppen inhibiert, während er bei beiden SN-Gruppen aktiviert ist (siehe Abbildung 48 bis 51). Dieser Glukokortikoidrezeptor ist für die Antwort auf inflammatorische Prozesse zuständig, eine Inhibierung also mit einem niedrigen Niveau inflammatorisch wirksamer Proteine verbunden [133]. Die vorhergesagte Aktivierung des *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF) für alle SN-Behandlungsgruppen im Gegensatz zur Inhibierung bei der AP2.5-Gruppe und nur einer sehr schwachen Aktivierung der AP25-Gruppe unterstützt diese Beobachtungen (siehe Abbildung 48, 49, 51 und 52 A). Der Zustand des TP53 Regulators konnte nur für die AP2.5, AP25 und SN5 Behandlungen vorhergesagt werden, in welchen er bei den NP-Gruppen jeweils inhibiert ist, bei der SN5 Gruppe jedoch aktiviert (Abbildung 52 B bis D). Da TP53 bei der Tumorrepression oder bei Einwirkung von äußeren Stressfaktoren wie UV-Licht aktiviert wird, ist eine Inhibierung mit der Aufrechterhaltung der Zellproliferation und damit des Tumorcharakters verbunden, eine Aktivierung spricht für die Induktion von Apoptose bzw. Unterbrechung des Zellzyklus [134]. *Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B-Cells* (NF κ B) ist in beiden NP-Gruppen inhibiert, in beiden SN-Gruppen jedoch aktiviert (siehe Abbildung 48 bis 51). Die Aktivierung von NF κ B spricht für die Antwort auf zelluläre Stresssymptome, eine Inhibierung für die Aufrechterhaltung des Tumorcharakters der Zellen [135]. Die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress, der z.B. mit der Aktivierung von NF κ B in Verbindung steht, aktiviert den Signalweg *Glutathion-mediated Detoxification*. Die Aktivierung dieses Abwehrmechanismus konnte bei allen Gruppen außer AP2.5 beobachtet werden. Signalwege, die nur bei den SN-Gruppen aktiviert werden beinhalten *Gap Junction Signaling*, *Acyl-CoA Hydrolysis* oder Signalwege die in den Zuckerstoffwechsel involviert sind wie z.B. *Glycolysis* und *Gluconeogenesis*.

Die nach der NP-Exposition angestoßenen Prozesse führten zu einer starken Deregulation von Proteinen in den Caco-2 Zellen und ebenfalls zu stark unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf NP und Silberionen. Dies ist umso bemerkenswerter, wenn man eine Aufnahme-studie mit Caco-2 Zellen und AgPure NP betrachtet, in der keine Aufnahme der Partikel nach 24 h festgestellt werden konnte aber dennoch Zytotoxizität nachgewiesen wurde, die dann

eher auf die ionischen Effekte zurückzuführen wäre [129]. Eine 21 tägige *in-vivo* Studie an Swiss-albino-Mäusen von Shahare *et. al.* konnte zeigen, dass die orale Aufnahme von Ag-NP zu einer Beschädigung der Microvilli der Darmepithelzellen führt, und damit eine Stress- bzw. inflammatorische Antwort ausgelöst werden kann, die in diesem Fall nur auf die NP zurückgeführt wurde [136]. Da sich die molekularen Effekte nach NP- bzw. SN-Behandlung in dieser Arbeit jedoch bei wichtigen vorhergesagten Effekten, wie z.B. der Aktivierung von TNF- α , stark unterscheiden, kann von einer alleinigen Wirkung durch die Ionen eher abgesehen werden und stattdessen eine synergistische Wirkung als wahrscheinlich gelten.

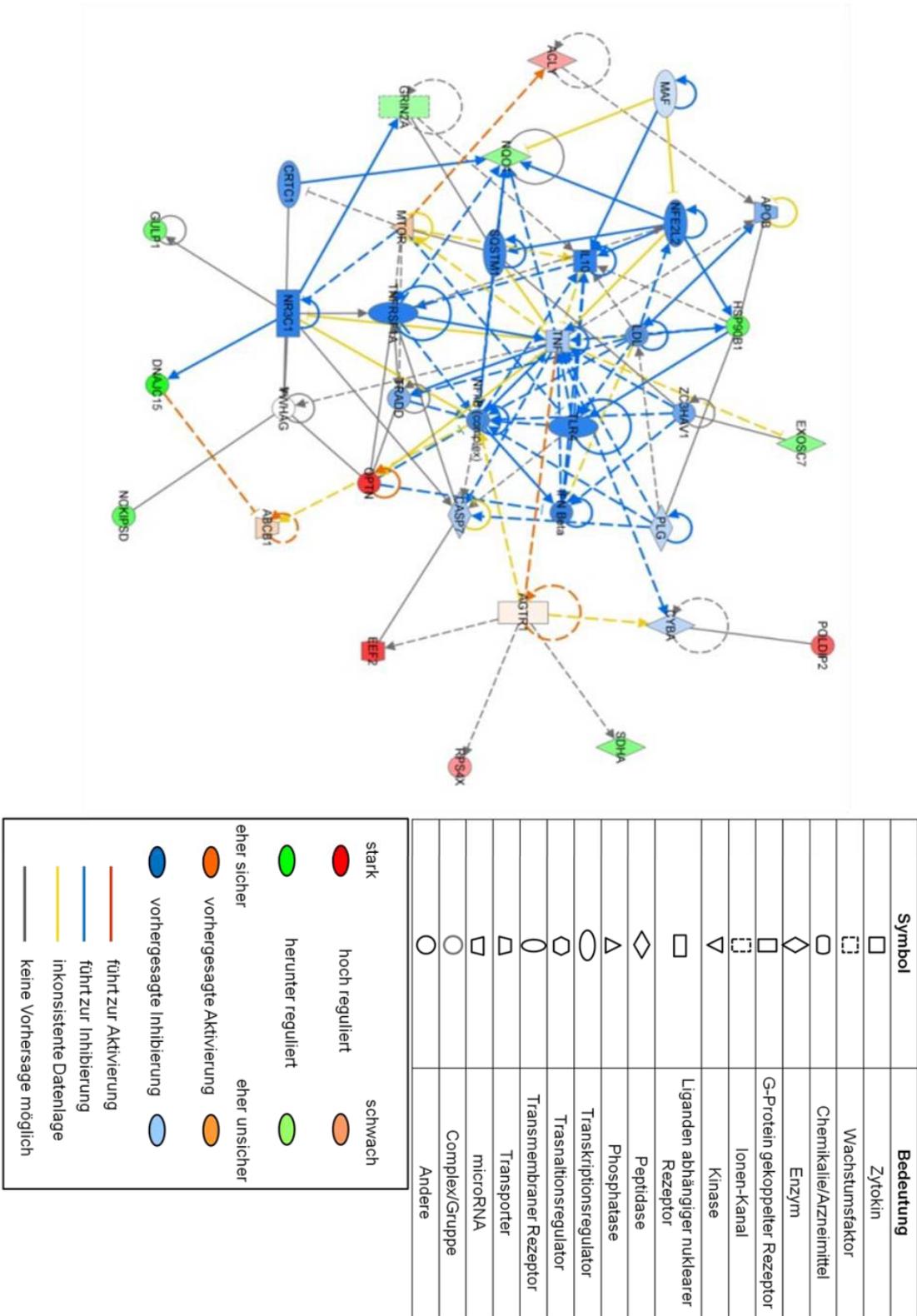


Abbildung 48 Von IPA vorhergesagtes Proteinnetzwerk für die Behandlungsgruppe AP2.5 (2.5 µg Ag mL⁻¹, vgl. Tabelle 8).

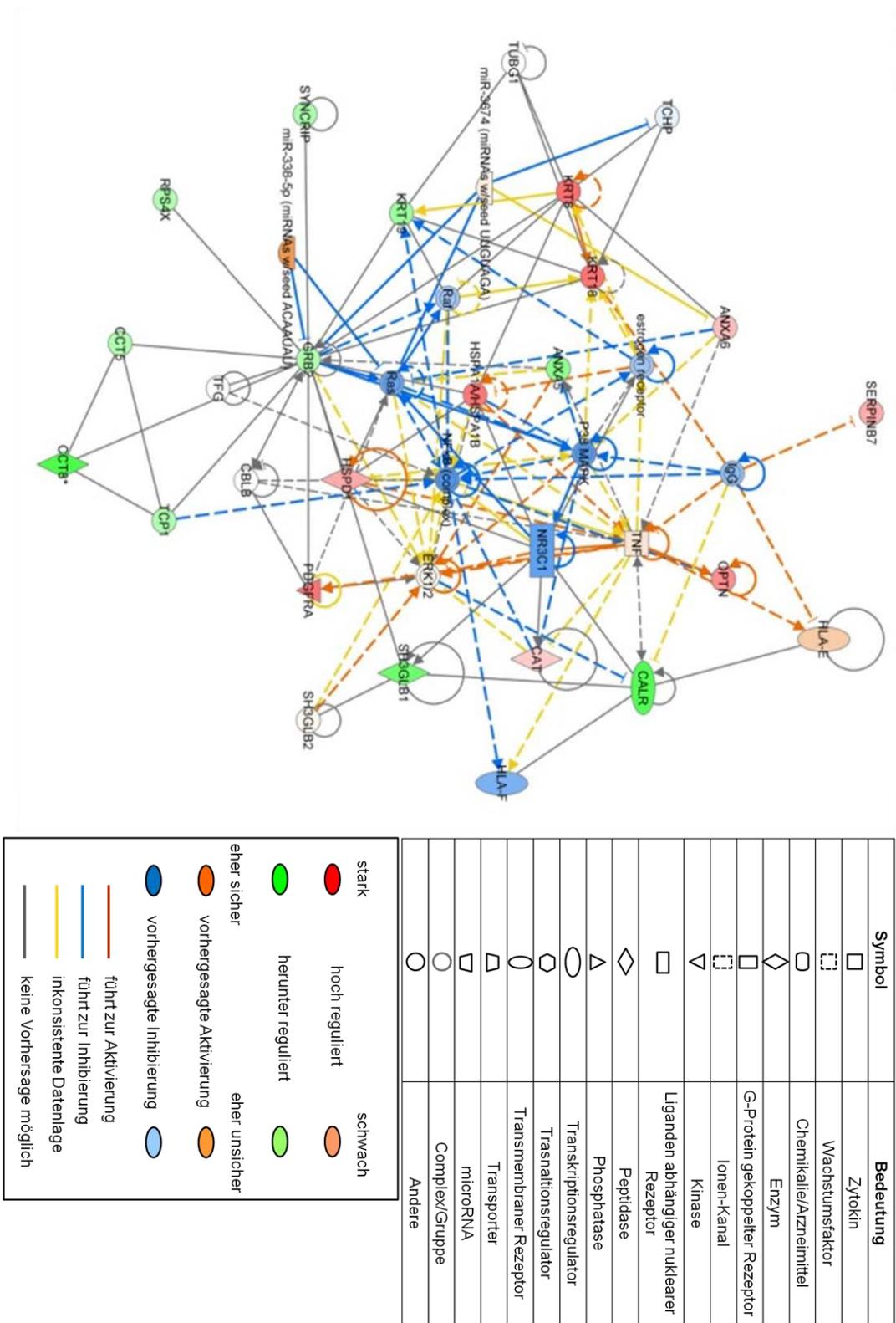
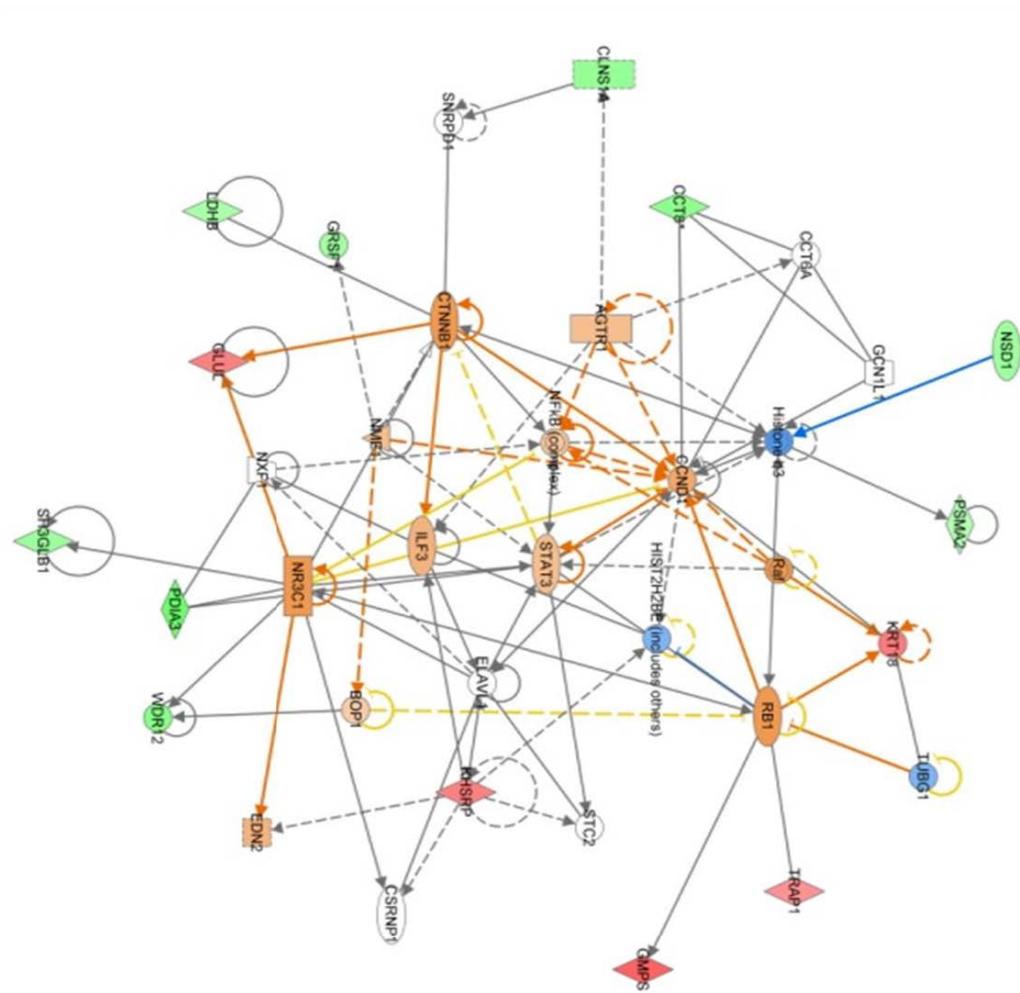


Abbildung 49 Von IPA vorhergesagtes Proteinnetzwerk für die Behandlungsgruppe AP25 (25 µg Ag mL⁻¹, vgl. Tabelle 8).



Symbol	Bedeutung
□	Zytokin
□	Wachstumsfaktor
◇	Chemikalie/Arzneimittel
◇	Enzym
□	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
▽	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
◇	Peptidase
△	Phosphatase
○	Transkriptionsregulator
○	Transnationregulator
○	Transmembraner Rezeptor
▽	Transporter
○	microRNA
○	Complex/Gruppe
○	Andere

Color	Regulation	Confidence
Red	stark	hoch reguliert
Green	herunter reguliert	eher unsicher
Orange	eher sicher	vorhergesagte Aktivierung
Blue	vorhergesagte Inhibierung	vorhergesagte Inhibierung
Red line	führt zur Aktivierung	
Blue line	führt zur Inhibierung	
Yellow line	inkonsistenteste Datenlage	
Grey line	keine Vorhersage möglich	

Abbildung 50 Von IPA vorhergesagtes Proteinnetzwerk für die Behandlungsgruppe SN0.5 (0.5 µg Ag mL⁻¹, vgl. Tabelle 8).

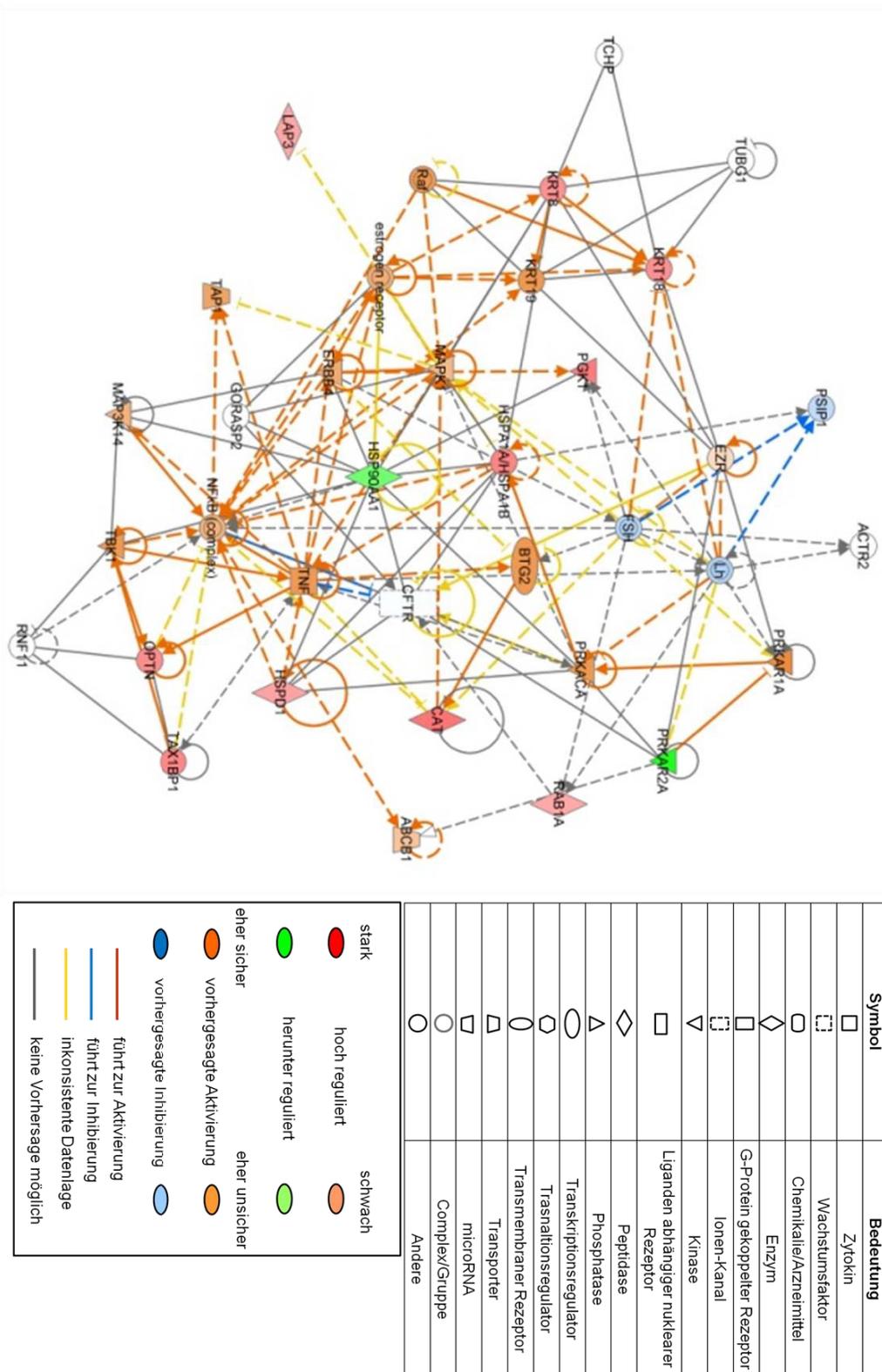
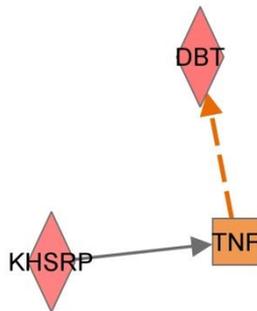
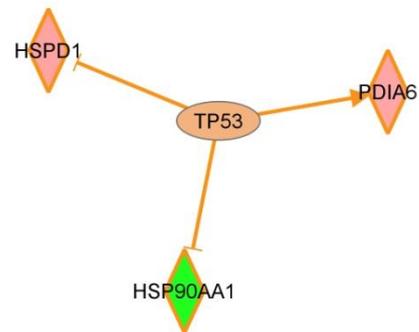


Abbildung 51 Von IPA vorhergesagtes Proteinnetzwerk für die Behandlungsgruppe SN5 ($5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$, vgl. Tabelle 8).

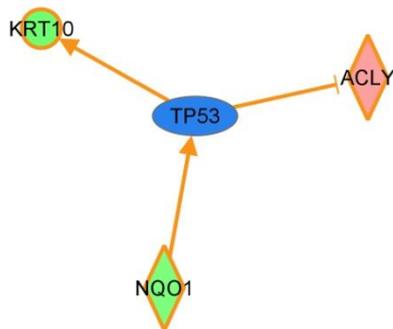
A



B



C



D

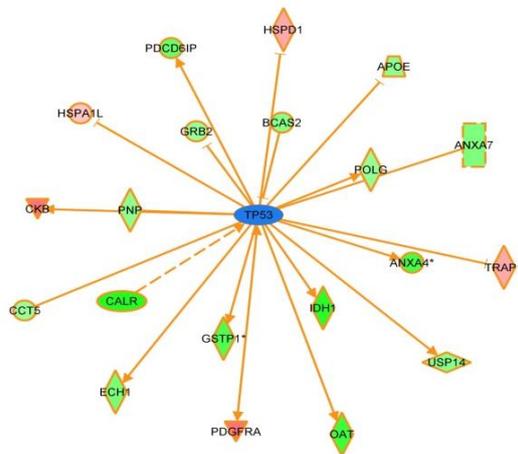


Abbildung 52: (A) zeigt die anhand experimentell deregulierter Proteine vorhergesagte Aktivierung von TNF bei SN0.5 und (B)-(D) zeigt eine Vorhersage der Effekte auf TP53 durch die Wechselwirkung mit experimentell ermittelten Proteinen für SN5 (B), AP2.5 (C) und AP25 (D). Für SN0.5 war in diesem Fall keine Vorhersage möglich.

Die in Abbildung 48 bis Abbildung 52 dargestellten Proteinnetzwerke und darin enthaltene deregulierte Proteine werden in den folgenden Kapiteln mit den von IPA prognostizierten Signaltransduktionswegen und zellulären Prozessen in Verbindung gesetzt.

5.2.2 Inflammatorische Prozesse

Aufgrund der Anzahl deregulierter Hitzeschockproteine (insgesamt neun) in den Behandlungsgruppen (siehe Tabelle 10 bis Tabelle 13 im Anhang), sollten Entzündungsreaktionen und Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eine Antwort der Zellen darstellen. Wie erwartet waren inflammatorische Prozesse (*Inflammatory Diseases* und *Inflammatory Response*) laut IPA in allen hoch dosierten, sowie der niedrig dosierten SN-Behandlungsgruppe involviert. Die Behandlungsgruppen AP25, SN5 und SN0.5 enthalten

das aktivierte proinflammatorische Zytokin TNF- α [137, 138], wobei die Aktivierung bei AP25 nur sehr schwach ausgeprägt ist (siehe Abbildung 48 bis 51). Für AP2.5 ist eine Inhibierung dieses Zytokins vorausgesagt. Weitere prognostizierte anti-inflammatorische Komponenten sind das Zytokin *Interleukin 10* (IL-10) sowie der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor (erythroid-derived-2) like 2* (NFE2L2) für AP2.5 und der Komplex NF κ B bei AP2.5 und AP25. Die prognostizierte Inhibierung dieser inflammatorischen Komponenten spricht für eine allgemein anti-inflammatorische Wirkung der NP [139]. Bei AP25 und AP2.5 ist NR3C1, ein Suppressor der Zytokinproduktion, inhibiert, was sich ebenfalls mit den Beobachtungen inhibierter inflammatorischer Prozesse deckt [140, 141]. Im Gegensatz dazu zeigen die SN-Gruppen mit der prognostizierten Aktivierung von TNF- α (SN0.5 und SN5), NR3C1 (SN5 und SN0.5) sowie TP53 (SN5) deutliche Anzeichen pro-inflammatorischer Prozesse.

Solche behandlungsgruppenspezifische Effekte sind auch ersichtlich, wenn man sich die Anzahl der experimentell identifizierten deregulierten Proteine ansieht, die pro-inflammatorischen Prozessen zugeschrieben werden. AP2.5 und SN0.5 zeigen nur wenige dieser Proteine auf, wozu z.B. das hochregulierte (\uparrow) *Keratin 1* (KRT1) und das herunterregulierte (\downarrow) *G-Rich Sequence Factor 1* (GRSF1) für die SN0.5 Gruppe und das herunterregulierte *Keratin 10* (KRT10) für die AP2.5 Gruppe gehören. Alle diese Proteine gelten aufgrund ihrer Deregulation (hoch- bzw. herunterreguliert) als anti-inflammatorisch bzw. den Prozess der Inflammation nicht unterstützend [142, 143]. Für AP2.5 decken sich diese Ergebnisse mit den IPA-Prognosen verschiedener Regulatoren des Netzwerkes aus Abbildung 52 A (IL-10, NF κ B sind inhibiert). Die SN0.5-Gruppe zeigt einen Unterschied zu ihren eher pro-inflammatorischen Regulatoren (NR3C1 und NF κ B sind aktiviert). Dies kann auf die niedrigen Konzentrationen zurückgeführt werden, die bei SN0.5 noch nicht ausreichen, eine entsprechende Proteinderegulation zu verursachen. Bei den hoch dosierten Gruppen ergibt eine Bewertung der experimentell ermittelten Proteine hinsichtlich ihrer Funktion bei der Antwort auf inflammatorische Prozesse Unterschiede zwischen SN und NP. SN5 zeigt etliche pro-inflammatorisch deregulierte Proteine (*Catalase* (CAT) \uparrow , *Optineurin* (OPTN) \uparrow , *Tubulin Beta-4 Chain* (TUBB4) \uparrow), während bei AP25 die Deregulation relevanter Proteine eher auf eine anti-inflammatorische Reaktion der Zellen hindeutet (*CapZB Protein* (CAPZB) \downarrow , *Calreticulin* (CALR) \downarrow , *Glutathione S-Transferase P* (GSTP1) \downarrow und *Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein* (VDAC2) \downarrow) [142-145]. Diese Ergebnisse decken sich mit den Proteinnetzwerken aus Abbildung 52 B und D, aus denen für AP25 eher anti-inflammatorische Prozesse abzuleiten sind (vorhergesagte Inhibierung von NR3C1, NF κ B und TP53) und für die SN-Gruppen eher eine Aktivierung der Inflammation.

Dennoch sind auch bei AP25 pro-inflammatorische Proteinderegulationen vorzufinden, die sich mit einigen aus der SN5-Gruppe überschneiden (z.B. CAT \uparrow), was auf aktivierte Teilprozesse der Inflammation hindeutet. Diesen Unterschied zwischen SN und Ag-NP kann man mit der verzögerten Freisetzung von Silberionen durch die NP und einer damit verzögerten inflammatorischen Antwort der Zellen erklären. Da die Exposition mit NP 24 h andauerte, konnte in dieser Zeit noch keine aktive inflammatorische Antwort der Zellen auf die Exposition mit Ag-NP festgestellt werden. Die Ergebnisse der zeitabhängigen Freisetzung von Silberionen durch die NP in dieser Arbeit (siehe Kapitel 5.1.6) unterstützten diese Vermutungen, da eine Ionenfreisetzung erst nach ca. 4 h beobachtet werden konnte. Bei den niedrig dosierten Gruppen reichte die Silberionen Konzentration über den genannten Zeitraum nicht aus, um eine ausreichende inflammatorische Antwort der Zellen auszulösen. Diese Ergebnisse decken sich nur zum Teil mit den 28-Tages *in-vivo* Studien von Hadrup *et al.* und van der Zande *et al.*. In der hochdosigen Studie (90 mg Ag kg⁻¹ Körpergewicht Tag⁻¹ als NP-Dosis und 9 mg Ag kg⁻¹ Körpergewicht Tag⁻¹ als SN-Dosis) von van der Zande *et al.* konnten weder inflammatorische Prozesse durch das Silbernitrat noch durch die NP in kultivierten Zellen aus Organen der Sprague-Dawley Ratten festgestellt werden [31]. Die Studie von Hadrup *et al.*, in der sub-akute Dosen an NP und Silberionen aus Silberacetat verwendet wurden (jeweils bis zu 9 mg Ag kg⁻¹ Körpergewicht Tag⁻¹), zeigte ebenfalls keine inflammatorischen Wirkungen durch NP und Ionen in Wistar Ratten [146]. Im Gegensatz dazu zeigten Park *et al.* in einer 14-Tages *in-vivo* Studie, dass verabreichte Ag-NP mit einer Silberkonzentration von 1 mg pro kg Körpergewicht und Tag deutliche inflammatorische Reaktionen in Bezug auf Aktivierung diverser Interleukine in Mäusen auslösten, wobei in dieser Arbeit keine Silberionen als Vergleich verabreicht wurden [30].

Die Reaktion der Caco-2 Zellen auf NP bzw. Ionen fiel am Beispiel der inflammatorischen Antwort der Zellen unterschiedlich aus. Beide NP-Konzentrationen riefen mehr anti-inflammatorische Proteinderegulationen hervor und zeigten von IPA prognostizierte inhibierte Zytokine wie TNF- α oder IL-10 (bei AP2.5), die Kinase p38 (AP25) sowie den Transkriptionsregulator NF κ B und TP53 (AP25 und AP2.5). Besonders die Übereinstimmung der IPA Voraussagen bezüglich der Inhibierung von NF κ B und TP53 bei beiden NP-Gruppen aber auch die Inhibierung von p38 bei AP25 unterstreicht die Wahrscheinlichkeit der anti-inflammatorischen Wirkung der NP. Fantini *et al.* konnten zeigen, dass eine starke Aktivierung von NF κ B zum Wachstum von Colon-Karzinomen und einer starken pro-inflammatorischen Zellantwort führte [147]. In Tumorzellen ist eine p53 Inaktivierung mit einer Aktivierung von NF κ B und damit vermehrter Entzündungsreaktion sowie Tumorzellwachstum verbunden, was im Falle dieser Arbeit laut IPA Prognose nicht der Fall war [148]. Eine Inhibierung von p38 ist laut Zarubin *et al.* und Schieven *et al.* mit einer Inaktivierung von

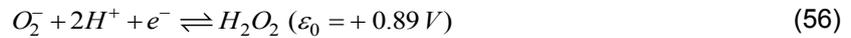
TNF- α verbunden [149, 150]. Dies konnte durch die hier vorliegende IPA Prognose bei AP25 nicht bestätigt werden, da TNF- α in dieser Behandlungsgruppe trotz p38 Inhibierung schwach aktiviert war. Dies könnte auf die im Vergleich zu AP2.5 höhere Freisetzung von Silberionen zurückgeführt werden, da SN in beiden Konzentrationen eine Aktivierung von TNF- α zeigte. Hier stellt sich also eine Grenze zwischen Aktivierung und Suppression einer inflammatorischen Antwort heraus, die bei einer Silberkonzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ in nanopartikulärer Form zu beginnen scheint. Die Zellen zeigten also keine bzw. nur sehr geringe Entzündungsreaktionen, die durch NP oder von ihnen freigesetzte Ionen hervorgerufen werden könnten. Diese Vermutung wurde durch die experimentell ermittelte Repression von GSTP1 als einem bei Entzündungen stärker exprimierten Protein bestätigt [151]. Die Arbeit von Tian et al. weist ebenfalls eine Inhibierung inflammatorischer Prozesse durch Ag-NPs auf und vermutet dahinter die Modulation bestimmter Interleukine durch die NP [152]. Die SN-Behandlung hingegen rief eine nahezu disparate Reaktion der Zellen hervor. NF κ B, TNF und TP53 wurden von IPA als aktiviert vorausgesagt, wobei dies durch die experimentell ermittelte Überexpression von CAT laut Jang *et al.* bestätigt werden konnte [153]. Die Ergebnisse für SN stehen in guter Übereinstimmung mit wissenschaftlichen Arbeiten zur Induktion inflammatorischer Prozesse durch SN [52, 154].

5.2.3 Zellulärer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Zusätzlich zu direkten inflammatorischen Prozessen waren die Untergruppen *Cellular Assembly and Organization* sowie *Cellular Compromise* in allen Behandlungsgruppen aktiviert, wobei die höchste Aktivierung in der AP25 Gruppe zu finden war. Aus diesen Prozessen hervorgehender zellulärer Stress kann zu Zelltod via Apoptose bzw. Nekrose führen, was auch durch etliche wissenschaftliche Arbeiten bestätigt wird [52, 116]. Im vorliegenden Datensatz ist der IPA Prozess *Apoptosis* in allen Behandlungsgruppen konzentrationsabhängig aktiviert. Da das Apoptoseverhalten von Krebszelllinien jedoch unterschiedlich im Vergleich zu gesunden Zellen ist, wird dieser Punkt im Abschnitt Gastrointestinalkrebs behandelt.

Durch Ag-NP ausgelöster oxidativer Stress kann mehrere Ursachen haben, die jedoch immer mit einem Mechanismus ähnlich der Fenton-Reaktion in Verbindung gebracht werden. Dabei kann Silber zum einen als Katalysator einer über Peroxid-Intermediate führenden Reaktion zu Hydroxylradikalen (OH^{\bullet}) agieren oder möglicherweise nach einer durch NADPH aktivierten Erzeugung von O_2^- zu H_2O_2 und dann weiter zu OH^{\bullet} führen [120, 155]. Der Generierung von O_2^- durch Silber steht jedoch zunächst das negative Redoxpotential von O_2 (Gleichung 55) und das positive Redoxpotential von Ag (Gleichung 54) entgegen.

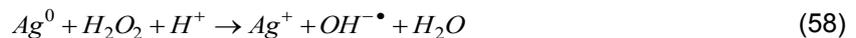
Die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) würde dagegen im Folgenden mit Elektronen des Ag^0 gelingen (Gleichung 56).



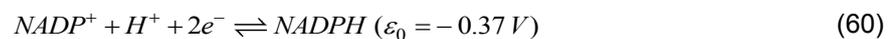
Ohne den Mechanismus vollständig aufzuklären, schlagen Liu *et al.* eine katalytische Funktion des Silbers sowohl bei der Generierung von H_2O_2 als auch bei der Weiterreaktion von Peroxid-Intermediaten zu Wasser vor (Gleichung 57).



He *et al.* beschreiben die Zwischenstufe von Gleichung 55 mit einem der Fenton-Reaktion ähnlichen Mechanismus (Gleichung 58), der mit dem Abbau von H_2O_2 durch Elektronen von Ag^0 konkurriert (Gleichung 59) [156].



Eine zweite Möglichkeit der Erzeugung von reaktiven Hydroxylradikalen bzw. Wasserstoffperoxid besteht in der reduzierenden Wirkung des Coenzym *Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADP(H)) als 2-Elektronen-Donor [155, 157]. Die Protonierung bzw. Deprotonierung dieser Spezies hat ein negativeres Redoxpotential als Gleichung 55 und wäre somit in der Lage diesen Schritt zu umgehen (Gleichung 60). In weiteren Schritten könnte es dann mittels Ag^0 zur Weiterreaktion zu H_2O_2 bzw. Hydroxylradikalen kommen (Gleichungen 56 und 58).



Die Reaktion der Zellen auf oxidativen-Stress zeigt ebenfalls einen Unterschied zwischen NP- und SN-Behandlungsgruppen. In der AP2.5-Gruppe sind die Proteine NADPH, *Dehydrogenase Quinone 1* (NQO1) und *Heat Shock Protein 90 B1* (HSP90B1) herunterreguliert, welches sowohl auf eine geringe Anzahl missgefalteter Proteine und ebenso nur geringe Konzentrationen von ROS-Spezies hindeutet. Silber NP und die von ihnen freigesetzten Ionen werden mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der sich daraus ergebenden Toxizität in Verbindung gebracht [33, 52, 158]. Der *Nrf2-Mediated Oxidative*

Stress Response Signalweg war in den untersuchten Zellen bei allen Behandlungsgruppen signifikant beeinflusst. Die NP-Gruppen zeigten eine Inhibierung des Signalweges, wohingegen die deregulierten Proteine der SN-Gruppen den Signalweg aktivierten (Abbildung 54 und 55 im Anhang). Dieses Verhalten spricht auch gegen die Erzeugung von ROS nach Gleichung 58, da hierfür zwar NADPH verbraucht werden müsste, aber im Gegenzug der Signaltransduktionsweg aktiviert wäre. Dies lässt bei der experimentell ermittelten Repression von NADPH auf eine geringe Anzahl ROS schließen. Die experimentell ermittelte Herunterregulierung von zwei Chaperonen (HSP90B1 und *Heat Shock Protein B7* (HSPB7)) in der AP2.5-Gruppe unterstützt die Vermutung der Inhibierung, da in der Veröffentlichung von Nakamura *et al.* die Induktion von inflammatorischen Prozessen durch ROS mit der Hochregulation von HSPB90B1 als einem wesentlichen Faktor erklärt wird [159]. Die Ergebnisse zur Entstehung des ER-Stresses, sowohl durch inflammatorische Prozesse als auch durch ROS, deuten auf konzentrationsabhängige Effekte innerhalb der Behandlungsgruppen hin. Während beide NP-Gruppen, wie zuvor beschrieben, anti-inflammatorische Zellreaktionen auslösen, also zellulären Stress verringern, zeigten SN-Gruppen entweder keine Auswirkung (SN0.5) oder erhöhte Stresssymptome (SN5). Im Falle des Nrf2-Signalwegs zeigen beide NP-Gruppen eine prognostizierte Inhibierung und die SN-Gruppen eine Aktivierung. Im Gegensatz zur Ap2.5-Gruppe wies AP25 jedoch hochregulierte Chaperone wie z.B. *Heat Shock 70 kDa Protein* (HSPA1A/HSPA1B) und *60 kDa Heat Shock Protein* (HSPD1) auf, welche eher mit der Unterbindung der Proteintranslation als Antwort auf erhöhten oxidativen Stress in Verbindung gebracht werden [160, 161]. Dieser Sachverhalt der AP25-Gruppe spricht für die Initiierung der ROS-Abwehr, obwohl der Nrf2-Signalweg davon noch nicht betroffen zu sein scheint. Die SN5-Gruppe zeigte ebenfalls überexprimierte Chaperone, was jedoch in diesem Fall zum Gesamtbild eines erhöhten oxidativen Stresses dieser Gruppe passt. Silberionen und Ag-NP können für eine Entfaltung bzw. Fehlfaltung von Proteinen sorgen, was eine Überexpression von Chaperonen, die diesen Prozessen entgegenwirken, wie im Falle der AP25-Gruppe, erklärt [82, 162]. Trotzdem zeigte SN0.5 keine signifikante Deregulation von Chaperonen, aber eine Aktivierung des ER-Stress durch die Überexpression von OPTN, welches im Zusammenhang mit der Fragmentierung des Golgi-Apparates steht, was als pro-apoptischer Marker gilt [163, 164]. Insgesamt lässt sich resümieren, dass NP ER-Stress, sei er durch Entzündungen oder ROS hervorgerufen, reduzieren, während SN signifikant ER-Stress bzw. oxidative Stresssymptome hervorruft, wobei SN0.5 deutlich schwächer wirkt als SN5.

Da vor allem die SN-Gruppen durch oxidativen Stress hervorgerufene Effekte aufweisen, scheinen vor allem die Silberionen zum oxidativen Stress beizutragen. Diese Ionen werden zwar auch in den NP-Gruppen generiert, jedoch langsamer an die Umgebung abgegeben bzw. erst zu einem späteren Zeitpunkt der NP-Exposition in größerem Umfang freigesetzt

(vgl. Kapitel 5.1.6). Die schwächere Wirkung von SN0.5 im Vergleich zu SN5 ist durch die geringere Silberionen Konzentration zu erklären. Warum beide NP-Behandlungsgruppen jedoch scheinbar ROS bzw. ROS-spezifische Zellreaktionen inhibieren können, ist mit den vorliegenden Proteindaten nicht ausreichend zu erklären. Ein möglicher Grund hierfür könnte die reduzierende Wirkung der Stabilisatoren von AgPure sein, die freie Silberionen wieder zu Ag^0 reduzieren [121]. Auch die reduzierend wirkende Glukose aus dem ZKM, welche wie die NP-Stabilisatoren Silberionen in elementares Silber überführen kann, wäre eine Erklärung für diese Phänomene [122]. Jokar *et al.* konnten die anti-oxidative Wirkung von Ag-NP, die mit kurzkettigem PEG stabilisiert wurden, durch die Reduktion von Diphenylpicrylhydrazyl-Radikalen nachweisen [165]. Diese Beobachtungen wurden in einer Arbeit von Yu *et al.* mit PEG-stabilisierten Eisenoxid-NP in einem *in-vitro* Modell mit Endothelzellen einer Schweineaorta ebenfalls bestätigt [166]. Diese anti-oxidativen Mechanismen reichen bei der hohen NP-Konzentration nicht mehr vollständig aus, um die ROS-Generierung ausreichend zu unterdrücken. Dadurch kann es dann bei AP25 trotz Inhibierung des Nrf2-Signalweges dazu kommen, dass die Expression von Chaperonen erhöht wird [167]. Die Induktion oxidativen Stresses durch Silberionen und die damit verbundene Aktivierung des Nrf2-Signalweges ist ein in vielen Publikationen bestätigter Effekt sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* [31, 43, 52, 168].

5.2.4 Gastrointestinalkrebs

Caco-2 Zellen verlieren während ihrer Differenzierung gewisse Charakteristika von Tumorzellen [169]. Anhand der Liste mit Krebs assoziierter Proteine (Tabelle 9) scheinen die NP diese Charakteristika noch weiter zu reduzieren. Es liegen bereits wissenschaftliche Arbeiten vor, die Ag-NP eine krebshemmende Wirkung aufgrund der Induktion von Apoptose oder dem Abfangen freier Radikale zuschreiben [170, 171]. Die angesprochene Rolle der Induktion von Apoptose kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da die Zellen nach Ende der Behandlung sowohl optisch kein Zeichen von Apoptose zeigten, als auch mehr anti- als proapoptotische Proteine bei beiden hoch dosierten Behandlungsgruppen aufwiesen (z.B. HSPA1A, *Heat Shock Protein 75 kDa* (TRAP1) oder GSTP1) [172-174]. Tumorzellen, zu denen auch Caco-2 Zellen gehören, zeigen ohne äußere Einwirkungen eine Inhibierung Caspase-induzierter Apoptose. Aus diesem Grund wurden der Signaltransduktionsweg der Apoptose und der des Fas-Liganden (Zelltodrezeptor) näher untersucht. Eine Vorhersage der Aktivierung bzw. Inhibierung des Apoptose-Signalweges konnte jedoch aufgrund der geringen Anzahl relevanter Proteine der Gruppen Ap2.5 und SN0.5 nur für die hoch dosierten Gruppen durchgeführt werden. Diese IPA Prognose zeigte eine Inhibierung der Caspasen 3, 6, 7 und 9 auf und damit auch eine Inhibierung der Apoptose (siehe Anhang, Abbildung 56). Diese anti-apoptotischen Eigenschaften der AP25-Gruppe wurde durch die be-

rechnete Inhibierung des Tumor-Suppressors TP53 unterstützt (Abbildung 52 C). Im Gegensatz dazu zeigt SN5 die Aktivierung von TP53, was dem Verhalten im Apoptose-Signalweg widerspricht.

Zusätzlich wurde der *Death Receptor Signaling*-Signalweg untersucht. In diesem Fall wurden für SN5 und AP25 inhibierte Initiator-Caspasen (Caspase-9) sowie inhibierte Effektor-Caspasen (Caspase-3 und 7) vorhergesagt, was zu einer prognostizierten Inhibierung der Apoptose für beide Gruppen führte (Abbildung 56 im Anhang). Der Signalweg ist zwar insgesamt durch die vorhergesagte Aktivierung des *FasL* Liganden durch Deregelung von *Death Domain Associated Protein 6* (DAXX) und *Heat Shock Protein Beta 1* (HSP27) bei AP25 und SN5 aktiviert, doch die herunterregulierte *Serine Protease* (HtrA2) führt zu einer Hochregulierung von *CARD-Like Apoptotic Protein* (cIAP), welches wie beim Apoptose-Signalweg zur prognostizierten Inhibierung der Caspasen 3, 6, 7 und 9 führte (Abbildung 57 und Abbildung 58 im Anhang). Im Kontrast zu den beiden hoch dosierten Behandlungsgruppen prognostiziert IPA für AP2.5 eine Aktivierung aller vier in diesem Signalweg involvierten Caspasen und damit eine Aktivierung der Apoptose (Abbildung 59 im Anhang). Für die hoch dosierten Gruppen ergibt sich die Inhibierung der Apoptose aus einem weiteren Punkt: Der für diese Gruppen aktivierte *PDGF Signaling-Pathway* inhibiert Apoptose (siehe Anhang Abbildung 60). Dieses von NP induzierte Verhalten der Zellen steht im Gegensatz zu einer Veröffentlichung von Satapathy, der eine Aktivierung von TP53 aufgrund der Aktivierung von Apoptose durch Ag-NP beobachtet [175]. Für SN0.5 konnte keine Prognose des Death Receptor Signaling Signalweges erhalten werden.

Aus diesem Signalweg heraus ergibt sich dadurch ein widersprüchliches Bild bei Betrachtung der Daten der Ap2.5-Gruppe, da diese den Apoptose-Signalweg mittels des FasL-Rezeptors aktiviert aber zugleich TP53 inhibiert. Zudem wird der SN5-Gruppe durch IPA eine anti-apoptotische Wirkung vorausgesagt, die Prognose der Aktivierung von TNF, NFκB und NR3C1 weist jedoch auf Stresssymptome der Zellen und damit eine durch z.B. TNF vermittelte Apoptose hin [176]. Somit ist Apoptose bei beiden hoch dosierten Behandlungsgruppen (AP25 und SN5) aufgrund der Caspase- und TP53-Aktivitäten inhibiert, die Reaktion der Zellen bei der AP2.5-Gruppe in diesem Bereich jedoch nicht klar definiert. Die Inhibierung von Apoptose bei beiden SN-Gruppen unter gleichzeitiger Aktivierung des Nrf2-Signalweges steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Zarubin et al., die bei erhöhten ROS in Tumorzellen die Induktion von Apoptose beobachteten [149]. Dies wäre ein Hinweis, dass die Induktion von ROS durch $5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ aus Silbernitrat nicht ausreicht oder die einzig Silberionen nicht ausreichen, in den Caco-2 Zellen Apoptose anzuregen. Die Effekte von AP2.5 hin-

sichtlich der Aktivierung apoptotischer Teilprozesse scheinen in diesem Zusammenhang eher durch Fehlinterpretationen von IPA zustande gekommen zu sein.

Ein weiterer Grund für die Anti-Tumor Aktivität von NP ist das Abfangen von freien Radikalen und der damit verminderten ROS-Bildung. Wie bereits in Kapitel 5.1.6 angesprochen wurde, zeigt AgPure für eine hohe Silberionen Freisetzung in ZKM. Die Stabilisatoren der Ag-NP enthalten jedoch zur Hälfte Tween20, welches durch die oxidierbaren Hydroxyl-Endgruppen eine reduzierende Wirkung ausüben kann, was sich auch in der Inhibierung des Nrf2-Signalweges für beide NP-Gruppen zeigt [167]. Auch der zweite Stabilisator der NP, Tagat TO V, enthält ähnliche aktive Gruppen, die ROS abfangen und reduzieren können. Aus diesem Grund könnten die NP auch andere Radikale, die für Zellstress bzw. in längerfristigen Effekten zu Krebs führen können, reduzieren und damit protektive Funktionen übernehmen. Jokar *et al.* konnte diese reduzierende Wirkung von kurzkettigem PEG auf Diphenylpicrylhydrazyl-Radikale feststellen [165]. Karakoti *et al.* wiesen diese Stabilisatoreigenschaften durch Reduktion von Wasserstoffperoxid in Gegenwart PEG-beschichteter Ce_2O_3 -NP nach [177]. Demzufolge zeigen NP auch in diesem Bereich eine den oxidativen Stress bzw. die Apoptose unterdrückende Funktion, wohingegen der Nrf2-Signalweg bei beiden SN-Gruppen aktiviert ist (siehe Anhang, Abbildung 55). In diesem Fall führt eine Inhibierung der Apoptose zu einem Überleben der Zellen unter gleichzeitigem Anstieg der ROS-Konzentration, was die Krebsfunktionen der Zelle aufrecht erhält, wie Banher *et al.* am Beispiel des *Non-Small-Cell Lung Cancer* zeigen konnten [178].

Alle Gruppen zeigten eine Aktivierung von Prozessen, die mit Gastrointestinalkrebs in Verbindung stehen, wobei SN0.5 die in diesem Bereich am geringsten aktivierte Gruppe war. Obwohl Tumorzellen bereits eine abnormale Proteinsynthese aufweisen, konnte eine Zunahme dieser Funktionen für beide hoch dosierten Behandlungsgruppen beobachtet werden. Zudem weisen Krebszelllinien, wie Caco-2 Zellen, bereits ohne äußere Einwirkung zelluläre Funktionen, die mit Krebs in Verbindung stehen, auf. Vergleicht man aber diese natürlich deregulierten Funktionen einer unbehandelten Kontrollgruppe mit denen der Behandlungsgruppen kann eine Vorhersage zur Beeinflussung dieser Funktionen durch exogene Faktoren, in diesem Fall die Einwirkung von NP, durchgeführt werden. Interessanterweise zeigen drei von vier Gruppen (AP25, AP2.5 und SN0.5) mehr deregulierte Proteine, die für eine Suppression von krebsbezogenen Zellmerkmalen, wie abnormaler Proliferation, stehen als solche, die die Krebsmerkmale der Zelle aufrechterhalten (Abbildung 53).

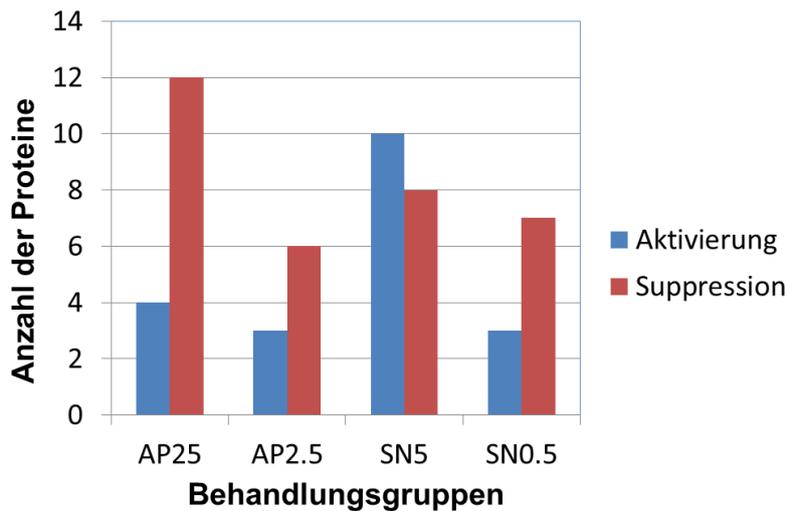


Abbildung 53: Vergleich der Effekte der deregulierten Proteine pro Behandlungsgruppe, die entweder aktivierend oder suppressiv auf Krebsmerkmale der Caco-2 Zellen wirken. Die höher dosierten Behandlungsgruppen zeigen jeweils eine stärkere Beeinflussung dieser Eigenschaften als die niedrig dosierten.

Unter diesen suppressiven Proteinen befinden sich z.B. *NQO1*, *ADP Sugar Pyrophosphatase* (NUDT5) und *T-Complex Protein 1* (CCT5), die z.B. bei Saaf *et al.* in einem Vergleich zwischen normalen humanen Colon-Zellen und Caco-2 Zellen für die Funktion gesunder Zellen standen [179, 180]. Die gesamte Liste der deregulierten Proteine der jeweiligen Behandlungsgruppen weist zudem eine Konzentrationsabhängigkeit auf (Tabelle 9).

Tabelle 9 Liste der mit Krebs assoziierten Proteine der jeweiligen Behandlungsgruppen aus Abbildung 53. Blau markiert sind Proteine, die durch ihre jeweilige Deregulation Krebsmerkmale aktivieren, rot solche, die Krebsmerkmale unterdrücken. Allen Proteinen ist eine Referenz zugeordnet, die belegt, dass dieses Protein direkt an Prozessen beteiligt ist, die Tumormerkmale verschiedener Zellen unterdrücken. Arf1 wurde zwar von IPA in die Gruppe der suppressiven Proteine geordnet, eine Referenz konnte jedoch nicht gefunden werden.

AP25	AP2.5	SN5	SN0.5
ADP-sugar Pyrophosphatase (NUDT5) [179]	ADP-sugar Pyrophosphatase (NUDT5) [179]	ADP-sugar Pyrophosphatase (NUDT5) [179]	ADP-sugar Pyrophosphatase (NUDT5) [179]
Enoyl CoA hydratase (ECHS1) [181]	Enoyl CoA hydratase (ECHS1) [181]	Glutathion S Transferase P (GSTP1) [145]	Glutathion S Transferase P (GSTP1) [145]
Annexin A4 (ANXA4) [180]	Keratin7 (KRT7)[182]	Glutamate dehydrogenase (GLUD1) [183]	Glutamine synthetase (GLUL) [184]
T-complex protein 1 subunit epsilon (CCT5) [179]	NADPH dehydrogenase (NQO1) [185]	60 kDa Heat shock protein (HSPD1) [186]	Acyl Coa binding protein (DBI) [180]
Short chain specific acyl Coa dehydrogenase (ACADS) [181]	Keratin10 (KRT10) [182]	Heat shock protein HSP-90 alpha (HSP90AA1) [187]	Glutamate dehydrogenase (GLUD1) [183]

Platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) [188]	Arf-gap with SH3 domain (ARF1)	Methylosome subunit (CLNS1A)[189]	Metallothionein 2 (CES1) [179]
T complex protein subunit alpha (TCP1) [180]	ATP citrate synthase (ACLY) [180]	Acyl Coa binding protein (DBI) [180]	Enoyl CoA hydratase (ECHS1) [181]
Isocitrate dehydrogenase (IDH1) [190]	Glutamat receptor ionotropic (GRIN2A) [191]	Metallothionein 2 (CES1) [179]	Catalase (CAT) [179]
Glutathion S Transferase P (GSTP1) [145]	Keratin18 (KRT18) [184]	Tubulin Beta 4B chain (TUBB4B) [183]	Heat shock protein 75 kDa (TRAP1) [179]
Glutathione S transferase omega (GSTO1) [183]		Protein disulfide isomerase (PDIA6) [192]	Keratin18 (KRT18)[184]
Keratin19 (KRT19) [182]		Keratin1 (KRT1) [193]	GMP synthase (GMPS) [179]
Metallothionein 2 (CES1) [179]		Phosphoglycerate kinase (PGK1) [194]	
Apolipoprotein 1 (APOE) [195]		Optineurin (OPTN) [196]	
MAPK/MAK/MRK overlapping kinase (MOK) [197]		Heat shock protein 70 kDa (HSPA1A/1B) [198]	
Heat Shock protein 75 kDa (TRAP1) [179]		Tax 1 binding protein (TAX1BP1) [199]	
Keratin18 (KRT18) [184]		Keratin18 (KRT18) [184]	
GMP synthase (GMPS) [179]		GMP synthase (GMPS) [179]	
		Catalase (CAT) [200]	

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tumor-hemmende Wirkung von NP nicht auf der Induktion von Apoptose zu beruhen schien, da weder die dafür zuständigen Signaltransduktionswege aktiviert wurden, noch eine Induktion über erhöhten oxidativen Stress vorlag. Die Zellen zeigten auch keine äußeren Anzeichen, die auf Apoptose hätten schließen lassen. Im Gegenteil zeigten die NP, und insbesondere ihre Stabilisatoren, Eigenschaften, die Radikale reduzieren. Dies führte zu verringerten Effekten von oxidativem Stress im Vergleich zu SN. Radikale abfangende NP könnten Zellen vor den Auswirkungen der durch ROS hervorgerufenen DNA-Modifikationen schützen. Dabei war interessant, dass auch Ag-NP, die eigentlich mit der Generierung von ROS in Verbindung stehen, diese Eigenschaften aufwiesen. In diesem Fall waren die reduzierenden Eigenschaften auf den Stabilisator der Partikel zurückzuführen. Obwohl die erhöhte Produktion von ROS in Tumorzellen mit der Induktion von Apoptose einhergehen kann und der Tumor so bekämpft werden könnte, zeigten sich diese Effekte selbst bei den Gruppen AP25 und SN5 nicht. Im Gegenteil waren bei SN5 mehr Proteine dereguliert, die Krebsmerkmale der Zellen aktivierten. Beide NP zeigten hier, wie allerdings auch SN, eine Mehrheit an suppressiven Proteinen, wobei durch diese Daten nicht auf eine generelle Tumor-Suppression durch NP geschlossen werden kann, da allein die Kürze der Zellexposition solche Schlussfolgerungen nicht zuließe.

5.2.5 Ubiquitinierung

Ein weiterer wichtiger aktivierter kanonischer Signalweg kann bei der Betrachtung von NP-Toxizitäten die Proteinubiquitinierung sein, da bestimmte NP in der Lage sind bei der Adsorption von Proteinen deren Konformation teilweise irreversibel zu ändern [201]. Diese Arbeit konnte sowohl die erhöhte Aktivierung des Proteinfaltungsprozesses (bei den Gruppen AP25 und SN5) zeigen, sowie eine Aktivierung des Signalweges Ubiquitination. Der letztgenannte war bei den Gruppen SN5 und AP25 signifikant aktiviert, aber zeigte bei den Gruppen AP2.5 und SN0.5 eine Inhibierung.

Die Konformationsänderungen können aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen des Partikelkerns oder hydrophoben Stabilisator-domänen mit den Proteinen stattfinden. Dadurch können hydrophobe α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen, die zuvor im Inneren der Proteine liegen, an die Oberfläche der Proteine gelangen, was zu einer Denaturierung der Proteine führt [23]. Triebkraft dieser Reaktion ist der Entropiegewinn durch Verdrängung von Wasser zwischen Protein und NP bzw. dessen Stabilisatoren. Diese denaturierten Proteine müssten in einer gesunden Zelle entweder durch Chaperone zurückgefaltet werden, oder mittels der Aktivierung des *Protein-Ubiquitination*-Signalweges entfernt werden, um pathologischen Veränderungen vorzubeugen [201]. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten zeigen in diesem

Zusammenhang einen weiteren Unterschied zwischen der Wirkung von NP und SN. In der vorliegenden IPA-Auswertung konnte die Aktivierung des Prozesses *Folding and Refolding of Proteins* nur bei den hoch dosierten Behandlungsgruppen (AP25 und SN5) beobachtet werden. IPA prognostizierte für die AP25-Gruppe eine Aktivierung des Protein-Ubiquitination-Signalweges, was auf einen ausreichenden Abbau der fehlgefalteten Proteine hindeutet. Diese Ergebnisse sind mit der Arbeit von Gagne *et al.* zu vergleichen, in der in Muscheln durch Proteinentfaltung an Ag-NPs die Ubiquitinierung dieser Proteine angeregt wurde [201]. Sollte die Konzentration an Chaperonen, die für die Entfaltung fehlgefalteter Proteine zuständig sind, zu gering sein, können Krankheiten wie Amyloidosen, zu denen auch Alzheimer gehört, die Folge sein [21]. Beide SN-Gruppen zeigten keine (SN0.5) oder eine sehr schwache (SN5) Aktivierung dieses Signalweges (siehe Anhang Abbildung 61 bis 64). Dies ist nicht überraschend, bedenkt man, dass SN als Modellsubstanz zur Induktion von Amyloidosen eingesetzt wird [202]. Die Daten für SN dieser Arbeit zeigen einen nur gering aktivierten *Protein-Ubiquitination*-Signalweg in Kombination mit der Unterexpression einiger Chaperone (*Heat Shock Protein HSP 90 alpha* (HSP90AA1) und *T-Complex Protein 1 Subunit Theta* (CCT8)), was zu einer erhöhten Konzentration denaturierter Proteine in der Zelle führen kann. Als Unterstützung dieser Daten ist der *Huntingtons Disease* Signalweg, eine Krankheit, die ebenfalls auf Proteinfehlfaltung beruht, in der SN5-Gruppe aktiviert (siehe Anhang Abbildung 65). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die NP und SN bei hohen Silberionenkonzentrationen die Aktivierung der Ubiquitinierung in den Caco-2 Zellen induzierten, wobei die Induktion durch die NP wesentlich stärker ausfiel, da sie eine größere Anzahl der in den Signalweg involvierten experimentell ermittelten Proteine aufwies. Die langsame Freisetzung von Ionen aus den NP erlaubt es den Zellen auf fehlgefaltete Proteine oder Carbonylierungen, erzeugt durch die NP oder ROS, zu reagieren und mittels aktivierter Ubiquitinierung zu entfernen. Da SN, und insbesondere SN5, sowohl eine Aktivierung des Nrf2-Signalweges als auch einer inflammatorischen Antwort zeigt, ist die Anzahl an Proteindefekten hier wahrscheinlich wesentlich höher. Die nur geringe Aktivierung der Ubiquitinierung kann in diesem Zusammenhang zu dauerhaften Proteinmodifikationen und damit einer veränderten Aktivität führen.

6 Zusammenfassung

Der Einsatz von antimikrobiellen Ag-NP in Textilien, Nahrungsergänzungsmitteln und verbrauchernahen Produkten wie Verpackungsmaterialien hat in den letzten 10 Jahren stark zugenommen und so ist Ag zusammen mit TiO_2 , ZnO , Kohlenstoff-Nanoröhren und SiO_2 eine der toxikologisch relevantesten NP Spezies. Mit der Lebensmittelinformationsverordnung 1169/2011 hat die EU sowohl eine erste Definition als auch Deklarationspflicht für Nanomaterialien geschaffen. Dies macht allerdings die physikalisch-chemische Charakterisierung in teilweise komplexen Matrices sowie die toxikologische Bewertung dieser Materialien erforderlich. Die Charakterisierung von Ag-NP und NP allgemein erfordert zunächst eine Separation der NP von ihren jeweiligen Matrices. Anschließend erfolgt die Bestimmung morphologischer Details, der physikalisch-chemischen Eigenschaften (Ladung, Größe etc.) und ihr chemisches Verhalten (Ionenfreisetzung, Oberflächenmodifikation, Aggregation etc.) in den Matrices. Um ihre toxikodynamischen bzw. -kinetischen Eigenschaften zu untersuchen, wurden *in-vivo* und *in-vitro* Studien durchgeführt.

Die Charakterisierung von NP weist große Unterschiede bezüglich angewandter Messtechniken selbst innerhalb einzelner NP-Spezies auf, die zu unterschiedlich interpretierbaren Ergebnissen führen. Ein Ansatz dieser Arbeit war es, ein Ensemble physikalisch-chemischer Charakterisierungsmethoden zu nutzen, welche sowohl alle Partikeleigenschaften abdecken, die für toxikologische Studien nötig sind, als auch einfach in der Anwendung und möglichst zerstörungsfrei sind. In dieser Arbeit wurden zwei Arten Ag-NP (AgPure, Nanocomposix) untersucht, die laut Hersteller ähnliche Partikelkernradien aufwiesen.

Zunächst wurde das Zetapotential beider Partikel bestimmt, welches Rückschlüsse auf Oberflächenladung und Stabilität ermöglicht. AgPure wies ein Zetapotential von -19 ± 5 mV und Nanocomposix von -23 ± 5 mV auf. Trotz nichtionischer Tenside (AgPure) und PVP (Nanocomposix) als Stabilisatoren lässt sich das negative Zetapotential auf die Adsorption von Hydroxylionen aus dem Wasser und die elektronegativen Sauerstoffatome der Stabilisatoren an der Oberfläche der Partikel zurückführen. Die NP waren während der Exposition der Zellen in ZKM suspensiert, und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften wurden demzufolge unter Einfluss dieser Matrix evaluiert. Für die Separation der NP vom Medium wurde die A4F mit einer *slot-outlet* Funktion in Kombination mit einem UV- und einem RI-Detektor verwendet. Die eluierten Partikel wurden mit einem Fraktionssammler in definierten Zeitintervallen aufgenommen. Beide Partikel zeigten nach 24 h Lagerung bei 37°C in ZKM eine Retentionszeitverzögerung von 5.3 (AgPure) und 6.1 Minuten (Nanocomposix) und damit Hinweise

auf eine Vergrößerung der R_H . Zudem wiesen beide Partikel eine Peakverbreiterung auf, was auf eine höhere Polydispersität der Partikel nach der Lagerung in ZKM hindeutet.

Es wurde ein Vergleich zwischen A4F und Ultrazentrifugation als Separationsmethoden für NP mit Korona von freien Proteinen und Stabilisatormolekülen durchgeführt. Hierbei wurden NP-Dispersion in ZKM mit einem Ag-Gehalt von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ mittels A4F und mit einem Silbergehalt von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ mittels Ultrazentrifugation bei $2000 \times g$ eingesetzt. Nach der Separation wurden die Koronae der NP mittels 2-DE untersucht. Dabei erwies sich die Methode der A4F als sensitiver, da sie weniger falsch positive Proteinfunde generierte.

Im Anschluss an die A4F Trennung wurden die Fraktionen mittels DLS untersucht, wobei ein retentionszeitabhängiger Anstieg der intensitätsgewichteten R_H beider Partikel nach Dispersion in ZKM festgestellt wurde. Anschließend wurden mittels 1-DE die proteinhaltigen Fraktionen ermittelt, wonach AgPure eine und Nanocomposix mehrere Proteinfaktionen aufwies. Für die weitere Analytik wurde ausschließlich diese Fraktion von AgPure genutzt. Bei den Nanocomposix Partikeln wurde die Fraktion gewählt, die alle Proteinbanden der weiteren Fraktionen enthielt. Der mittlere R_H der AgPure Partikel nahm in den ausgewählten Fraktionen von 12.4 nm auf 21.9 nm zu, der der Nanocomposix Partikel von 13.1 nm auf 47.2 nm . Eine nachfolgende SAXS Analytik ergab keine signifikante Erhöhung der Partikelkernradii nach Dispersion in ZKM und nur geringe Aggregatbildung von etwa fünf Prozent. Nanocomposix Partikel wiesen zudem in ZKM eine geringere Polydispersität auf als in A4F Eluent.

Um die chemische Zusammensetzung der Partikeloberfläche zu untersuchen, wurden EDX Messungen der proteinhaltigen Fraktionen beider NP aufgenommen. An der Oberfläche der NP in A4F Eluent wurde eine erhöhte Konzentration von Sauerstoff nachgewiesen, welche durch die Stabilisatoren hervorgerufen wurde. Nach Lagerung in ZKM zeigten die Partikel eine Akkumulation von Schwefel in der Nähe der NP-Oberfläche, welches von Cysteingruppen aus Proteinen stammen könnte. Um die Zusammensetzung der Proteinkorona zu untersuchen, wurden von den proteinhaltigen Fraktionen der Partikel 1-DE und 2-DE Analysen durchgeführt. BSA, das höchst abundante Protein in ZKM, war der Hauptbestandteil beider Koronae. Zusätzlich fanden sich bei AgPure sechs und bei Nanocomposix fünf weitere Proteine, wobei die Proteine Serpin B6 und Protein S-100 A auf beiden Partikeln zu finden waren. Diese Proteine wurden auch in anderen Publikationen als Koronakomponenten erwähnt, ihre Bedeutung für die zelluläre Aufnahme bzw. auf mögliche NP-Effekte konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. BSA hingegen kann die zelluläre Aufnahme von NP unterdrücken oder vollständig unterbinden.

Die Ionenfreisetzung der Partikel nach 24 h bzw. einer Woche in ZKM und Wasser wurde mittels Dialyse und anschließender ICP-MS Analytik evaluiert. Beide Partikel waren im Versuchszeitraum in Wasser stabil, AgPure zeigte jedoch eine deutlich geringere Ionenfreisetzung (ca. 5 % entgegen ca. 15 % bei Nanocomposix sowohl nach 24 h als auch einer Woche). Die PEO-Gruppen der Stabilisatoren von AgPure sorgen zum einen für eine Hydrathülle, die es weiteren Wassermolekülen erschwert, den Silberkern zu erreichen und unter Erzeugung von Hydroxylionen Silberionen freizusetzen. Zum anderen sind sie in der Lage, Silberionen durch die Hydroxy- und Carbonylgruppen des Stabilisators zu binden. Diese Eigenschaften wies PVP als Stabilisator nicht auf. In ZKM zeigen beide Partikel ähnliches Verhalten mit einer Ionenfreisetzung von ca. 15 % (AgPure) und ca. 17 % (Nanocomposix) nach 24 h und ca. 24 % (AgPure) sowie 22 % (Nanocomposix) nach einer Woche. Für die stärkere Ionenfreisetzung in ZKM war die Salzkonzentration entscheidend, wie ein Vergleichsexperiment von AgPure in einer Kochsalzlösung ergab. Bei hohen Salzkonzentrationen wie in ZKM war das Ausfallen von AgCl vernachlässigbar gering, da die Summe des nachgewiesenen Silbers im Dialysat und innerhalb der Dialysemembran nur sehr geringe Abweichungen von der ursprünglichen Menge zeigte. Zusätzlich zeigte AgPure eine verzögerte Freisetzung der Ionen, die erst nach ca. 4h begann und daher in der Betrachtung der möglichen Effekte der Silberionen mit einbezogen werden muss.

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand darin, die Toxikodynamik von AgPure im Vergleich zu Silberionen aus SN in einem humanen Caco-2 Zellmodell, welches ein Abbild des intestinalen Aufnahmewegs darstellt, zu ermitteln. Kriterien, die zur Wahl der eingesetzten Partikelkonzentrationen führten, waren kein signifikantes apoptotisches Verhalten der Zellen und ein vergleichbares zytotoxisches Verhalten bei den jeweiligen niedrig bzw. hoch dosierten Behandlungskonzentrationen. Die differenzierten Zellen wurden nach Böhmert *et al.* für 24 h mit je zwei Dispersionen von AgPure ($2.5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$) und zwei SN-Lösungen ($0.5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$) behandelt [203]. Anschließend wurden die lysierten Zellen mittels 2-DE untersucht und die Proteinderegulation im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe ausgewertet. Die Proteine mussten hierfür einen FC ≤ -1.4 oder $\geq +1.4$ aufweisen.

Die bioinformatische Analyse zeigte, dass mit AgPure behandelte Zellen mehr deregulierte Proteine aufwiesen als mit SN behandelte (308 bei AgPure zu 108 bei SN). Es wurden insgesamt wesentlich mehr Proteine herunter als hochreguliert (286 zu 130). Mit AgPure behandelte Zellen wiesen ein Verhältnis von 232 hoch zu 76 herunterregulierten Proteinen auf. Die SN Behandlungsgruppe sowohl 54 hoch als auch herunterregulierte Proteine. Caco-2 Zellen zeigen hier eine signifikante Präferenz für herunterregulierte Proteine durch AgPure,

während die Behandlung mit SN keine präferentielle Proteinderegulation zur Folge hatte. Von den für die spätere bioinformatische Auswertung gewählten Proteinen konnten 91 % der hochregulierten und 75 % der herunterregulierten Proteine identifiziert werden. Von den daraus resultierenden 184 Proteinen entfielen 115 spezifisch auf AgPure Behandlungsgruppen, und 45 waren spezifisch in den SN-Behandlungsgruppen vorhanden. 24 Proteine waren sowohl in einer AgPure- als auch einer SN-Gruppe dereguliert, wobei die Übereinstimmung zwischen der hohen AgPure und der hohen SN Konzentration am größten war (10 gemeinsame Proteine). Diese Befunde lieferten einen ersten Hinweis auf eine unterschiedliche Toxikodynamik von Ag-NP und SN.

Die identifizierten Proteine wurden für eine bioinformatische Analyse mittels IPA genutzt, um Signaltransduktionswege vorherzusagen, die durch die Behandlung mit NP bzw. SN in den Zellen verändert wurden. Die in den Zellen aktivierten Funktionen mit der höchsten Signifikanz, der größten Übereinstimmung mit dem jeweils vorhandenen Proteinmuster, waren bei den hohen NP- bzw. SN-Konzentrationen *Post Translational Modifications*, *Cell Death and Survival* sowie *Protein Folding*. Bei den niedrigen NP- bzw. SN-Dosen bestand die einzige Übereinstimmung in der Funktion Cellular Development. Eine bessere Übereinstimmung zwischen den hohen Dosen war anhand der zuvor festgestellten höheren Übereinstimmung von deregulierten Proteinen dieser Gruppen zu erwarten. Die von IPA berechneten Netzwerke beinhalten Transkriptionsregulatoren, deren Aktivierung bzw. Inhibierung Rückschlüsse über die in den Zellen angestoßenen Prozesse liefern können. Es wurden keine signifikant aktivierten ($z\text{-score} \geq 2$) URs gefunden. Für alle Behandlungsgruppen wurden mit IPA-Vorhersagen über die Aktivierung bzw. Inhibierung dieser URs und damit verbundener deregulierter Proteine aus den jeweiligen Behandlungsgruppen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl *TP53*, *TNF* (bei der niedrigen NP-Dosis), *NFkB* als auch der Glukokortikoidrezeptor *NR3C1* bei den NP-Gruppen inhibiert waren, was für geringe Stresseinwirkung auf die Zellen sprach, wohingegen *NR3C1*, *TP53*, *NFkB* und *TNF* bei den SN-Gruppen aktiviert wurden und damit klare zelluläre Stresssymptome erkennbar waren. In der hoch dosierten NP-Gruppe wurden trotz aktivierten Inflammatory Disease Signalwegs viele Proteine, die wie *CALR* oder *GSTP1* mit Entzündungen in Verbindung stehen, negativ reguliert, sprachen also gegen aktive inflammatorische Prozesse. Da die Exposition der Zellen nur 24 h andauerte und die NP die Ionen, die für die inflammatorische Reaktion verantwortlich sind, nur langsam freisetzen, war *TNF* bei der hohen NP-Konzentration aktiviert. Die Inaktivierung von *NFkB* und *TP53* ließ aber vermuten, dass, im Gegensatz zur hohen SN Konzentration, keine akute inflammatorische Antwort bestand. Bei der niedrigen NP-Dosis zeigten sich im Gegensatz zur geringen SN-Dosis gar keine Anzeichen einer inflammatorischen Reaktion.

Der Nrf2 Signalweg wurde bei beiden NP-Gruppen als inhibiert vorhergesagt, wohingegen die SN-Gruppen zu einer Aktivierung führten. Dies ging einher mit mehreren hochregulierten Chaperonen wie HSPA1A bei den SN-Gruppen. Trotz Inhibierung des Signalweges durch die hoch dosierte NP-Gruppe, wurden jedoch auch in diesem Fall mehrere Chaperone wie das zuvor beschriebene HSPA1A hochreguliert, was an der höheren Dosis und damit auch erhöhten Ionenfreisetzung lag. Dennoch zeigen die NP-Behandlungsgruppen eher verringerte Antwort auf oxidativen Stress, was durch die Funktion der Hydroxylgruppen der NP-Stabilisatoren erklärt wurde, die freie Silberionen abfangen können. Zudem wurden die Ionen von den NP erst ca. 4 h nach Exposition der Zellen in erhöhtem Maße freigesetzt, so dass innerhalb der Dauer des Experimentes auch dies ein Grund für die geringe Entwicklung von ROS und damit verbundener zellulärer Effekte gewesen sein könnte.

Die Veränderung der Regulation tumorassoziierter Proteine in den Caco-2 Zellen stellte einen weiteren Unterschied zwischen NP- und SN-Behandlung dar. Beide NP-Gruppen sowie die gering konzentrierte SN-Gruppe zeigten eine erhöhte Anzahl von Proteinen deren Deregulationsmuster tumorassoziierter Proteine für eine Suppression der Tumormerkmale sprach. Die größte Wirkung in diesem Bereich hatte die hoch dosierte NP-Gruppe. Die hoch dosierte SN-Gruppe zeigte hingegen eher eine Aktivierung bzw. Beibehaltung der Tumormerkmale der Zellen. Generell verlieren Caco-2 Zellen während ihrer Differenzierung Merkmale von Tumorzellen, eine solch starke Auswirkung wie bei der hohen NP Dosis war damit jedoch nicht zu erklären. Da sich die Wirkungen der beiden niedrigen Dosen der Behandlungsgruppen glichen, bei den hohen Dosen jedoch große Unterschiede bestanden, konnte in diesem Fall von einer NP-spezifischen Wirkung ausgegangen werden.

Ag- und andere Metall-NP (z.B. Kupfer) stehen in Verbindung mit der Initiierung irregulärer Proteinfaltungen, die, sollte sie nicht durch Chaperone rückgängig gemacht werden, letztendlich nur durch Ubiquitinierung der fehlgefalteten Proteine behoben werden kann. Die hoch dosierte NP-Gruppe zeigte in diesem Zusammenhang eine vorhergesagte Aktivierung des Protein-Ubiquitination Signalweges, während bei der gering dosierten SN-Gruppe keine Aktivierung und bei der hohen SN-Dosis nur eine schwache Aktivierung vorlag. Eine bioinformatische Analyse mit IPA für diesen Signalweg konnte für die niedrige NP-Dosis nicht durchgeführt werden. Die verringerte Aktivität des Abbaus fehlgefalteter Proteine im Bereich der SN-Gruppen könnte zu einem erhöhten Risiko für Amyloidosen führen. Diese Vermutung wurde durch die Aktivierung des *Amyloidosis* Signalwegs bzw. des *Huntingtons Disease* Signalweges ausschließlich durch SN-Gruppen bestätigt.

Aus den Auswertungen der bioinformatischen Analysen lässt sich schlussfolgern, dass die hier untersuchten Silbernanopartikel und Silberionen eine stark unterschiedliche Toxikody-

namik aufweisen. Das humane Caco-2 Enterozytenmodell zeigte nach 24 h wesentlich geringere Stresssymptome nach NP-Behandlung im Vergleich zu der Behandlung mit SN. Dabei führte die Freisetzung von Silberionen durch die NP während der Zellexposition zu ähnlichen Ionenkonzentrationen wie in der SN-Gruppe. Die NP konnten wahrscheinlich dank ihrer Stabilisatoren und der langsamen Ionenfreisetzung für eine Reduktion von ROS sorgen, die somit nicht wie beim SN zu ausgeprägten zellulären Stresssymptomen führte. Die Effekte von Ag-NPs mit einer Konzentration von $25 \mu\text{g Ag mL}^{-1}$ auf ein Modell des menschlichen Dünndarms können somit als relativ unbedenklich angesehen werden. Die Expositionsdauer von 24 h ist im Vergleich zur normalen Passagezeit durch den Dünndarm von ca. 8 h auf jeden Fall ausreichend lang gewählt. Dabei muss beachtet werden, dass nach 24 h eine weitere Ionenfreisetzung durch die NP erfolgte und somit eine längere Exposition neu bewertet werden müsste. Eine Extrapolation dieser Daten auf die Effekte *in-vivo* ist nicht zu erwägen, da die Bioverfügbarkeit der Partikel stark mit den Stabilisatoreigenschaften bzw. allgemein den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Partikel variiert. Studien an Ratten zur oralen Aufnahme der auch in dieser Arbeit verwendeten NP zeigte jedoch selbst bei einer hohen täglich verabreichten NP-Dosis keine akuten zellulären Stresssymptome. Dies sind Hinweise, dass auch die in dieser Arbeit verwendeten NP-Konzentrationen zumindest im Tierexperiment keine akute Toxizität bzw. zellulären Effekte hervorrufen würden.

7 Ausblick

Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine physikalisch-chemische Charakterisierung der Partikel in bzw. vor *in-vitro* Experimenten notwendig ist, um Partikelmodifikationen durch Agglomeration, Proteine oder Ionenfreisetzung zu evaluieren, da diese einen signifikanten Einfluss auf die molekularen Wirkungen der NP nehmen können. In weiteren Arbeitsschritten könnte zusätzlich zur Koronakomposition mittels einzeln ausgewählter ZKM-Proteinen die Adsorptionskinetik der Partikel untersucht werden. In einem nächsten Schritt könnte diese dann mit verschiedenen Partikelkernmaterialien bzw. Stabilisatoren untersucht werden. Mittels EDX-Messungen könnten Bilder der Zusammensetzung der Partikelkorona während der *in-vitro* Versuche im zeitlichen Verlauf aufgenommen werden, um zum einen die Veränderung der Korona zu betrachten und zum anderen die Depletion möglicher essentieller Zellbestandteile. Außerdem wäre ein Vergleich der Aufnahme von NP mit verschiedenen Koronae in Zellen und die damit verbundene Präferenz bestimmter Koronaproteine eine sinnvolle Erweiterung der bisherigen Arbeiten. Auch eine Verifizierung von IPA vorhergesagter Proteine mittels Western-Blot und Polymerase Kettenreaktion wäre für eine bessere Interpretation der IPA-Daten sinnvoll.

Da das Caco-2 Modell nur einen späten Zeitpunkt der oralen Aufnahme wiedergibt, wäre eine Betrachtung der proteomischen Antwort der Caco-Zellen nach einem künstlichen Verdau, der die Mund- und Magenbedingungen widerspiegelt, eine sinnvolle Ergänzung. Zusätzlich könnte das Caco-2 Modell in einer Co-Kultur mit HT-29 Zellen ein besseres Abbild des menschlichen Darmes darstellen, da eine schleimbildende Komponente hinzugefügt würde. Diese Schritte werden aber die Analytik der Partikel erschweren, da die entstehende Korona noch komplexer wird und Glykoproteine wie Mucine sowohl die A4F Trennung als auch die 2-DE Analytik erschweren.

8 Abkürzungsverzeichnis

1-DE	Eindimensionale SDS-Gelelektrophorese
2-DE	Zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese
ALT	Alanin-Transaminase
AST	Aspartat-Transaminase
BSA	Bovines Serumalbumin
A4F	Asymmetrischer Fluss-Feldflussfraktionierung
Ag-NP	Silbernanopartikel
AP2.5, AP25	Behandlungsgruppen der Caco-2 Zellkultur mit einer AgPure-Konzentration von 2.5 µg Ag mL ⁻¹ bzw. 25 µg Ag mL ⁻¹
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-Propansulfonat
CI	Chemische Ionisierung
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX	Elektronendispersive Röntgenfluoreszenz
EI	Elektrische Ionisierung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC	Fold Change (Änderung der Quantität der Expression eines Proteins)
FFF	Feldflussfraktionierung
FKS	Fötales Kälberserum
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICR	Ionen-Cyclotron Resonanz Analysatoren
IL	Interleukine
IR	Infrarot
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
ITS	Zellkulturmedium (DMEM) angereichert mit Insulin (ca. 4 µg mL ⁻¹), Transferrin (ca. 4 µg mL ⁻¹) und Natriumselenid (ca. 5 µg mL ⁻¹)
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molekulargewichtsgößenausschluss
NP	Nanopartikel
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEO	Polyethylenoxid
PDI	Polydispersitätsindex
PES	Polyethersulfon
PVP	Polyvinylpyrrolidon

R	Widerstand
RI	Brechungsindex
R _H	Hydrodynamischer Radius
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Statische Lichtstreuung
SN	Silbernitrat
SN5, SN0.5	Behandlungsgruppen der Caco-2 Zellkultur mit einer Silbernitratkonzentration von 5 bzw. 0.5 µg Ag mL ⁻¹
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
Tagat® TO V	Polyoxyethylen (25)-glycerin-trioleat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tween20™	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TOC	Total Organic Carbon (Gesamtkohlenstoffgehalt)
ToF	Flugzeitmassenanalysator
UR	Transkriptionsregulator
UV	Ultraviolett
WWIC	Woodrow Wilson International Center for Scholars
ZKM	Zellkulturmedium (DMEM) inklusive 10% fötalem Kälberserum (≈ 0.35 g Gesamtprotein L ⁻¹)

Proteinabkürzungen

ACADS	Short chain specific acyl Coa dehydrogenase
ACLY	ATP citrate synthase
ANXA4	Annexin A4
APOE	Apolipoprotein 1
ARF1	Arf-gap with SH3 domain
CALR	Calreticulin
CAPZB	CapZB Protein
CAT	Catalase
CCT5	T-Complex Protein 1
CCT8	T-Complex Protein 1 Subunit Theta
CES1	Metallothionein 2
cLAP	CARD-Like Apoptotic Protein
CLNS1A	Methylosome subunit
DAXX	Death Domain Associated Protein 6
DBI	Acyl Coa binding protein
ECHS1	Enoyl CoA hydratase
GLUD1	Glutamate dehydrogenase

GLUL	Glutamine synthetase
GMPS	GMP synthase
GRIN2A	Glutamat receptor ionotropic
GRSF1	G-Rich Sequence Factor 1
GSTO1	Glutathione S transferase omega
GSTP1	Glutathione S-Transferase P
HSP27	Heat Shock Protein Beta 1
HSP90AA1	Heat shock protein HSP-90 alpha
HSP90B1	Heat Shock Protein 90 B1
HSPA1A/1B	Heat Shock 70 kDa Protein
HSPB7	Heat Shock Protein B7
HSPD1	60 kDa Heat Shock Protein
HtrA2	Serine Protease
IDH1	Isocitrate dehydrogenase
IL-10	Interleukin 10
KRT1	Keratin 1
KRT10	Keratin 10
KRT18	Keratin18
KRT19	Keratin19
KRT7	Keratin7
MOK	MAPK/MAK/MRK overlapping kinase
NADPH	Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived-2) like 2
NFkB	Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B-Cells
NQO1	Dehydrogenase Quinone 1
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1
NUDT5	ADP Sugar Pyrophosphatase
OPTN	Optineurin
PDGFRA	Platelet derived growth factor receptor alpha
PDIA6	Protein disulfide isomerase
PGK1	Phosphoglycerate kinase
TAX1BP1	Tax 1 binding protein
TCP1	T complex protein subunit alpha
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TP53	Cellular Tumor Antigen p53
TRAP1	Heat Shock Protein 75 kDa
TUBB4	Tubulin Beta-4 Chain
VDAC2	Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein

9 Literaturverzeichnis

1. Feynman RP. There`s plenty of room at the bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 1992;1(1):60-6.
2. Haruta M, Kobayashi T, Sano H, Yamada N. Novel gold catalysts for the oxidation of Carbon-Monoxide at a temperature far below 0-degrees-C. *Chemistry Letters*. 1987(2):405-8.
3. Rossler A, Skillas G, Pratsinis SE. Customized materials - Nanoparticles: Materials of the future. *Chemie in Unserer Zeit*. 2001;35(1):32-41.
4. Link S, El-Sayed MA. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *Journal of Physical Chemistry B*. 1999;103(40):8410-26.
5. Schulenburg M. Nanopartikel, kleine Dinge-große Wirkung, Chancen und Risiken. Bonn and Berlin, Germany: Federal Ministry of Education and Research, *Materials Nan*; 2008.
6. Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, et al. Nanomaterials in the environment: Behaviour, Fate, Bioavailability, and Effects. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 2008;27(9):1825-51.
7. Alexander JW. History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*. 2009;10(3):289-92.
8. Lem KW, Choudhury A, Lakhani AA, Kuyate P, Haw JR, Lee DS, et al. Use of Nanosilver in Consumer Products. *Recent Pat Nanotechnology*. 2012;6(1):60-72.
9. Wijnhoven SO, AG; Sips,AJAM; Bourgeois,FC; Kooi, MW; Bakker, MI. Development of an inventory for consumer products containing nanomaterials. 2010.
10. Association NI. Regulatory Monitoring Database 2012 [updated 2012; cited 2006]. Available from: <http://www.nanotechia.org/>.
11. Materials ASfTa. Standard Terminology relating to Nanotechnology. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials; 2006.
12. Institution BS. Terminology for Nanomaterials. London, UK: British Standards Institution; 2007.
13. Potočnik J. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance In: Commision E, editor. Brussels: European Commision; 2011. p. 38-40.
14. Rejeski D. Nanotechnology and Consumer Products. Bethesda, MD, 20814: Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2009 2009.08.18. Report No.
15. Scholars WWCfl. Consumer Products Inventory [Internet]. 2013 [updated 2013]. Available from: <http://www.nanotechproject.org/cpi/>.
16. Feng QL, Kim TN, Wu J, Park ES, Kim JO, Lim DY, et al. Antibacterial effects of Ag-HAp thin films on alumina substrates. *Thin Solid Films*. 1998;335(1-2):214-9.
17. Santoro CM, Duchsherer NL, Grainger DW. Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*. 2007;3(2):55-65.
18. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J ProteomeRes*. 2006;5(4):916-24.
19. Bidgoli SA, Mahdavi M, Rezayat SM, Korani M, Amani A, Ziarati P. Toxicity assessment of nanosilver wound dressing in Wistar rat. *Acta medica Iranica*. 2013;51(4):203-8.
20. Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Molecular Pharmaceutics*. 2009;6(5):1388-401.
21. Schluesener JK, Schluesener HJ. Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. *Arch Toxicol*. 2013;87(4):569-76.
22. Lundqvist M, Sethson I, Jonsson BH. Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*. 2004;20(24):10639-47.
23. Liu RT, Sun F, Zhang LJ, Zong WS, Zhao XC, Wang L, et al. Evaluation on the toxicity of nanoAg to bovine serum albumin. *Science of the Total Environment*. 2009;407(13):4184-8.
24. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008;233(3):404-10.
25. Soto K, Garza KM, Murr LE. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2007;3(3):351-8.
26. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*. 2006;6(8):1794-807.

27. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622-7.
28. AshaRani PV, Mun GLK, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *Acs Nano*. 2009;3(2):279-90.
29. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2009;23(6):1076-84.
30. Park E-J, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010;30(2):162-8.
31. van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Rivera ZH, Serrano-Rojero CS, et al. Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. *Acs Nano*. 2012;6(8):7427-42.
32. Bouwmeester H, Poortman J, Peters RJ, Wijma E, Kramer E, Makama S, et al. Characterization of Translocation of Silver Nanoparticles and Effects on Whole-Genome Gene Expression Using an In Vitro Intestinal Epithelium Coculture Model. *Acs Nano*. 2011;5(5):4091-103.
33. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *Journal of Physical Chemistry B*. 2008;112(43):13608-19.
34. Choi O, Hu ZQ. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(12):4583-8.
35. Bohmert L, Niemann B, Thunemann AF, Lampen A. Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Arch Toxicol*. 2012;86(7):1107-15.
36. Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui MKJ. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(23-24):1841-8.
37. Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puntès V. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *Acs Nano*. 2010;4(7):3623-32.
38. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009;8(7):543-57.
39. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 40(4):328-46.
40. Karmali PP, Simberg D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 8(3):343-57.
41. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R, et al. Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein-Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. *Acs Nano*. 4(12):7481-91.
42. Milani S, Bombelli FB, Pitek AS, Dawson KA, Raedler J. Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *Acs Nano*. 2012;6(3):2532-41.
43. Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles- Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*. 2011;208(3):286-92.
44. Chen R, Choudhary P, Schurr RN, Bhattacharya P, Brown JM, Ke PC. Interaction of lipid vesicle with silver nanoparticle-serum albumin protein corona. *Applied Physics Letters*. 100(1):013703-4.
45. R. Winter FN. *Methoden der biophysikalischen Chemie*. Ch. Elschenbroich FH, H.Hopf, editor. Stuttgart, Germany 1998. 591 p.
46. Baier G, Costa C, Zeller A, Baumann D, Sayer C, Araujo PHH, et al. BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake. *Macromol Biosci*. 2011;11(5):628-38.
47. Böhmert L, Girod M, Hansen U, Maul R, Knappe P, Niemann B, et al. Analytically Monitored Digestion of Silver Nanoparticles and their Toxicity for Human Intestinal Cells. *Nanotoxicology*. 2013;0(ja):1-37.
48. Andriik I. Einfluss der nichtionischen Tenside Tween® 20, Tween® 80 und Pluronic® F-68 auf die Interaktion von Nanopartikeln mit Caco-2 Einzelzellen [Diploma Thesis]. Wien, Austria: University of Wien; 2008.
49. Gopinath P, Gogoi SK, Sanpui P, Paul A, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 77(2):240-5.
50. Hsin YH, Chena CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*. 2008;179(3):130-9.

51. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*. 2005;19(7):975-83.
52. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1. *Toxicology Letters*. 2009;190(2):156-62.
53. Giddings JC, Barman BN, Liu MK. SEPARATION OF CELLS BY FIELD-FLOW FRACTIONATION. *Acs Symposium Series*. 1991;464:128-44.
54. ME Schimpf KC, JC Giddings. *Field-Flow-Fractionation Handbook*: John Wiley & Sons; 2000 22.08.2000. 616 p.
55. Giddings JC. FIELD-FLOW FRACTIONATION - ANALYSIS OF MACROMOLECULAR, COLLOIDAL, AND PARTICULATE MATERIALS. *Science*. 1993;260(5113):1456-65.
56. Prestel H, Schott L, Niessner R, Panne U. Characterization of sewage plant hydrocolloids using asymmetrical flow field-flow fractionation and ICP-mass spectrometry. *Water Research*. 2005;39(15):3541-52.
57. Anderson DES. *Understanding Flight*. second Edition ed: McGraw-Hill Professional; 2009. 306 p.
58. Glatter Otto ; Kratky Otto HKC, Kirste R., Kostorz G., Laggner P., Leopold H. Müller K., Oberthür R.C., Pilz I., Porod G., Stuhmann H., Vonk C.G., Zippner G. *Small Angle X-Ray Scattering*: Academic Press; 1982. 516 p.
59. Stribeck N. *X-Ray Scattering of Soft Matter*. Hamburg: Springer; 2007. 260 p.
60. Schreiber F. Static and dynamic light scattering (DLS/SLS) [Picture]. University of Tübingen; 2009 [updated 2013; cited 2013]. Available from: <http://www.soft-matter.uni-tuebingen.de/images/Qandfluct.png>.
61. Provencher SW. CONTIN - A GENERAL-PURPOSE CONSTRAINED REGULARIZATION PROGRAM FOR INVERTING NOISY LINEAR ALGEBRAIC AND INTEGRAL-EQUATIONS. *Computer Physics Communications*. 1982;27(3):229-42.
62. Karas M, Hillenkamp F. LASER DESORPTION IONIZATION OF PROTEINS WITH MOLECULAR MASSES EXCEEDING 10000 DALTONS. *Analytical Chemistry*. 1988;60(20):2299-301.
63. Zenobi R, Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 1998;17(5):337-66.
64. Karas M, Kruger R. Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews*. 2003;103(2):427-39.
65. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003;376(7):952-65.
66. Rousset M, Laburthe M, Pinto M, Chevalier G, Rouyerfessard C, Dussaux E, et al. Enterocytic Differentiation And Glucose-Utilization in the Human-Colon Tumor-Cell Line CACO-2 - Modulation by Forskolin. *Journal of Cellular Physiology*. 1985;123(3):377-85.
67. Sambuy Y, Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology*. 2005;21(1):1-26.
68. Buhrke T, Lengler I, Lampen A. Analysis of proteomic changes induced upon cellular differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *Development, Growth & Differentiation*. 2011;53(3):411-26.
69. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. CHARACTERIZATION OF THE HUMAN-COLON CARCINOMA CELL-LINE (CACO-2) AS A MODEL SYSTEM FOR INTESTINAL EPITHELIAL PERMEABILITY. *Gastroenterology*. 1989;96(3):736-49.
70. Kohlbrecher JB, I. SASfit. 0.93.4 ed. CH-5232 Villigen PSI: Paul Scherrer Institut; 2007.
71. Oberemm A, Ahr HJ, Bannasch P, Ellinger-Ziegelbauer H, Gluckmann M, Hellmann J, et al. Toxicogenomic analysis of N-nitrosomorpholine induced changes in rat liver: Comparison of genomic and proteomic responses and anchoring to histopathological parameters. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009;241(2):230-45.
72. Lamanda A, Zahn A, Roder D, Langen H. Improved Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics*. 2004;4(3):599-608.
73. Ingenuity. IPA Network Generation Algorithm: IPA Systems; 2005 [updated 2005; cited 2005]. Available from: <http://www.ingenuity.com/wp-content/themes/ingenuitytheme/pdf/ipa/IPA-netgen-algorithm-whitepaper.pdf>.
74. Behera M, Ram S. Spectroscopy-based study on the interaction between gold nanoparticle and poly(vinylpyrrolidone) molecules in a non-hydrocolloid. *International Nano Letters*. 2013;3(1):17.

75. Zhang Z, Zhao B, Hu L. PVP Protective Mechanism of Ultrafine Silver Powder Synthesized by Chemical Reduction Processes. *Journal of Solid State Chemistry*. 1996;121(1):105-10.
76. Hada H, Yonezawa Y, Yoshida A, Kurakake A. Photoreduction of silver ion in aqueous and alcoholic solutions. *The Journal of Physical Chemistry*. 1976;80(25):2728-31.
77. McLean DJ, Giese AC. Absorption spectra of proteins and amino acids after ultraviolet irradiation. *J Biol Chem*. 1950;187(2):537-42.
78. Absalan G, Ghaemi M. Investigating the parameters affecting the adsorption of amino acids onto AgCl nanoparticles with different surface charges. *Amino Acids*. 2012;43(5):1955-67.
79. Seney CS, Gutzman BM, Goddard RH. Correlation of Size and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Optical and Spectroscopic Properties for Silver Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*. 2009;113(1):74-80.
80. Desai R, Mankad V, Gupta SK, Jha PK. Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*. 2012;4(1):30-4.
81. Garrido C, Aliaga AE, Gómez-Jeria JS, Cárcamo JJ, Clavijo E, Campos-Vallette MM. Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. *Vibrational Spectroscopy*. 2012;61(0):94-8.
82. Wang J, Jensen UB, Jensen GV, Shipovskov S, Balakrishnan VS, Otzen D, et al. Soft Interactions at Nanoparticles Alter Protein Function and Conformation in a Size Dependent Manner. *Nano Letters*. 2011;11(11):4985-91.
83. Wang YY, Jiang YX, Susha A, Rogach A, Sun SG. Effect of pH and Au Nanoparticles on Cytochrome c Investigated by Electrochemistry and UV-Vis Absorption Spectroscopy. *Acta Physico-Chimica Sinica*. 2012;28(5):1127-33.
84. Stiles PL, Dieringer JA, Shah NC, Van Duyne RR. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*. Annual Review of Analytical Chemistry. 12008. p. 601-26.
85. Basu S, Jana S, Pande S, Pal T. Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: Assembly quantified through SPRS and SERS. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008;321(2):288-93.
86. Huynh KA, Chen KL. Aggregation Kinetics of Citrate and Polyvinylpyrrolidone Coated Silver Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolyte Solutions. *Environmental Science & Technology*. 2011;45(13):5564-71.
87. Gondikas AP, Morris A, Reinsch BC, Marinakos SM, Lowry GV, Hsu-Kim H. Cysteine-Induced Modifications of Zero-valent Silver Nanomaterials_Surface Chemistry, Aggregation, Dissolution, and Silver Speciation. *Environ Sci Technol*. 46(13):7037-45.
88. Kaltenboeck K. *Chromatographie fuer Dummies*. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2010. 384 p.
89. Dubascoux S, Von Der Kammer F, Le Hécho I, Gautier MP, Lespes G. Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation. *Journal of Chromatography A*. 2008;1206(2):160-5.
90. Erickson H. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online*. 2009;11(1):32 - 51.
91. Ferrer ML, Duchowicz R, Carrasco B, de la Torre JG, Acuna AU. The conformation of serum albumin in solution: A combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. *Biophysical Journal*. 2001;80(5):2422-30.
92. Safi M, Courtois J, Seigneuret M, Conjeaud H, Berret JF. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(35):9353-63.
93. Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *Journal of Physical Chemistry C*. 2008;112(15):5825-34.
94. Norde W. My voyage of discovery to proteins in flatland ... and beyond. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2008;61(1):1-9.
95. Aichmayer B, Margolis HC, Sigel R, Yamakoshi Y, Simmer JP, Fratzl P. The onset of amelogenin nanosphere aggregation studied by small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering. *J Struct Biol*. 2005;151(3):239-49.
96. Allouni ZE, Cimpan MR, Hol PJ, Skodvin T, Gjerdet NR. Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2009;68(1):83-7.
97. Scientist Ra. AgPure Quality certificate Regensburg: Rent a Scientist; 2010. Available from: http://rasmaterials.com/pdf/AgPURE_QualityCertificate_E.pdf.
98. Datenblatt N. Nanocomposix Datasheet 2012 [13.12.2013]. Available from: <http://nanocomposix.com/de/products/silver/spheres/20-nm>.

99. Halperin A. Polymer brushes that resist adsorption of model proteins: Design parameters. *Langmuir*. 1999;15(7):2525-33.
100. Leckband D, Sheth S, Halperin A. Grafted poly(ethylene oxide) brushes as nonfouling surface coatings. *J Biomater Sci-Polym Ed*. 1999;10(10):1125-47.
101. Babchin AJ, Schramm LL. Osmotic repulsion force due to adsorbed surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012;91(0):137-43.
102. Huang HH, Ni XP, Loy GL, Chew CH, Tan KL, Loh FC, et al. Photochemical Formation of Silver Nanoparticles in Poly(N-vinylpyrrolidone). *Langmuir*. 1996;12(4):909-12.
103. Li H-J, Zhang A-Q, Hu Y, Sui L, Qian D-J, Chen M. Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer. *Nanoscale Research Letters*. 2012;7(1):612.
104. Stolnik S, Illum L, Davis SS. Long circulating microparticulate drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995;16(2&€3):195-214.
105. Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, Degennes PG. PROTEIN SURFACE INTERACTIONS IN THE PRESENCE OF POLYETHYLENE OXIDE .1. SIMPLIFIED THEORY. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1991;142(1):149-58.
106. Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2000;18(3-4):301-13.
107. Shemetov AA, Nabiev I, Sukhanova A. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. *Acs Nano*.6(6):4585-602.
108. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke BR, Mader K, Muller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;196(2):245-9.
109. Treuel L, Malissek M, Grass S, Diendorf J, Mahl D, Meyer-Zaika W, et al. Quantifying the influence of polymer coatings on the serum albumin corona formation around silver and gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14(9).
110. Florin E, Kjellander R, Eriksson JC. Salt effects on the cloud point of the poly(ethylene oxide)+ water system. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. 1984;80(11):2889-910.
111. Norde W, Gage D. Interaction of bovine serum albumin and human blood plasma with PEO-tethered surfaces: Influence of PEO chain length, grafting density, and temperature. *Langmuir*. 2004;20(10):4162-7.
112. Malynych S, Luzinov I, Chumanov G. Poly(Vinyl Pyridine) as a Universal Surface Modifier for Immobilization of Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002;106(6):1280-5.
113. Smith JN, Meadows J, Williams PA. Adsorption of polyvinylpyrrolidone onto polystyrene latices and the effect on colloid stability. *Langmuir*. 1996;12(16):3773-8.
114. Miklos AC, Li C, Sharaf NG, Pielak GJ. Volume Exclusion and Soft Interaction Effects on Protein Stability under Crowded Conditions. *Biochemistry*. 2010;49(33):6984-91.
115. Wang Y, Li C, Pielak GJ. Effects of Proteins on Protein Diffusion. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(27):9392-7.
116. Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*. 2010;100(2):151-9.
117. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials*. 2006;27(24):4356-73.
118. Abbott Chalew TE, Schwab KJ. Toxicity of commercially available engineered nanoparticles to Caco-2 and SW480 human intestinal epithelial cells. *Cell biology and toxicology*. 2013;29(2):101-16.
119. Kittler S. Synthese, Löslichkeit und biologische Aktivität von Silber-Nanopartikeln
Dissertation. Germany: University Duisburg-Essen; 2009.
120. Liu J, Hurt RH. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ Sci Technol*. 2010.
121. Silvert P-Y, Herrera-Urbina R, Tekaiia-Elhsissen K. Preparation of colloidal silver dispersions by the polyol process. *Journal of Materials Chemistry*. 1997;7(2):293-9.
122. Mehta SK, Chaudhary S, Gradzielski M. Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles generated by sugar reduction in micellar media. *J Colloid Interface Sci*. 2010;343(2):447-53.

123. Kittler S, Greulich C, Diendorf J, Koller M, Epple M. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials*. 22(16):4548-54.
124. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *ELECTROPHORESIS*. 1999;20(18):3551-67.
125. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(7):2050-5.
126. Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggad T, Donnelly SC, Cagney G, et al. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2007;46(30):5754-6.
127. Shannahan JH, Lai X, Ke PC, Podila R, Brown JM, Witzmann FA. Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *Plos One*. 2013;8(9).
128. Kielland J. Individual activity coefficients of ions in aqueous solutions. *J Am Chem Soc*. 1937;59:1675-8.
129. Boehmert L. Aufnahme und Toxizität von Silbernanopartikeln im Intestinalmodell Caco-2 [Dissertation]. Germany: Technische Universität Berlin; 2013.
130. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(38):14265-70.
131. He XM, Carter DC. ATOMIC-STRUCTURE AND CHEMISTRY OF HUMAN SERUM-ALBUMIN. *Nature*. 1992;358(6383):209-15.
132. Stebounova LV, Guio E, Grassian VH. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(1):233-44.
133. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1711-23.
134. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 Mutations in Human Cancers. *Science*. 1991;253(5015):49-53.
135. Gilmore TD. Introduction to NF-kappa B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-4.
136. Shahare B, Yashpal M, G. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2013;23(3):161-7.
137. Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, Armaka M, Apostolaki M, Pizarro T, et al. Genetic Dissection of the Cellular Pathways and Signaling Mechanisms in Modeled Tumor Necrosis Factor-induced Crohn's-like Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(12):1563-74.
138. Christen V, Capelle M, Fent K. Silver nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(2):519-28.
139. Stępkowski TM, Brzóska K, Kruszewski M. Silver nanoparticles induced changes in the expression of NF-κB related genes are cell type specific and related to the basal activity of NF-κB. *Toxicology in Vitro*. (0).
140. Hiscott J. Convergence of the NF-κB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine & growth factor reviews*. 2007;18(5):483-90.
141. Conti P, Pang X, Boucher W, Letourneau R, Reale M, Barbacane RC, et al. Impact of Rantes and MCP-1 Chemokines on In Vivo Basophilic Cell Recruitment in Rat Skin Injection Model and Their Role in Modifying the Protein and mRNA Levels for Histidine Decarboxylase. *Blood*. 1997;89(11):4120-7.
142. Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, Liu AC, Khan S, Shirasaki F, et al. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Experimental Dermatology*. 2007;16(6):513-9.
143. Yoon SW, Kim TY, Sung MH, Kim CJ, Poo H. Comparative proteomic analysis of peripheral blood eosinophils from healthy donors and atopic dermatitis patients with eosinophilia. *Proteomics*. 2005;5(7):1987-95.
144. Carlen LM, Sanchez F, Bergman AC, Becker S, Hirschberg D, Franzen B, et al. Proteome analysis of skin distinguishes acute guttate from chronic plaque psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005;124(1):63-9.

145. Hayes J, Pulford D. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445-600.
146. Hadrup N, Loeschner K, Bergstrom A, Wilcks A, Gao X, Vogel U, et al. Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. *Arch Toxicol.* 2012;86(4):543-51.
147. Fantini MC, Pallone F. Cytokines: From gut inflammation to colorectal cancer. *Current Drug Targets.* 2008;9(5):375-80.
148. Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes & cancer.* 2011;2(4):503-16.
149. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15(1):11-8.
150. Schieven GL. The biology of p38 kinase: A central role in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2005;5(10):921-8.
151. Luo L, Wang Y, Feng Q, Zhang H, Xue B, Shen J, et al. Recombinant protein glutathione S-transferases P1 attenuates inflammation in mice. *Molecular Immunology.* 2009;46(5):848-57.
152. Tian J, Wong KKY, Ho C-M, Lok C-N, Yu W-Y, Che C-M, et al. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem.* 2007;2(1):129-36.
153. Jang B-C, Paik J-H, Kim S-P, Shin D-H, Song D-K, Park J-G, et al. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cellular Signalling.* 2005;17(5):625-33.
154. Cronholm P, Karlsson HL, Hedberg J, Lowe TA, Winnberg L, Elihn K, et al. Intracellular Uptake and Toxicity of Ag and CuO Nanoparticles: A Comparison Between Nanoparticles and their Corresponding Metal Ions. *Small.* 2013;9(7):970-82.
155. JS BIGHLSV. *Bioinorganic Chemistry: University Science Books; 1994. 611 p.*
156. He W, Zhou Y-T, Wamer WG, Boudreau MD, Yin J-J. Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials.* 2012;33(30):7547-55.
157. Huang H, Wang S, Moll J, Thauer RK. Electron Bifurcation Involved in the Energy Metabolism of the Acetogenic Bacterium *Moorella thermoacetica* Growing on Glucose or H₂ plus CO₂. *Journal of Bacteriology.* 2012;194(14):3689-99.
158. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters.* 2011;201(1):92-100.
159. Nakamura N, Shimaoka Y, Tougan T, Onda H, Okuzaki D, Zhao H, et al. Isolation and Expression Profiling of Genes Upregulated in Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells of Rheumatoid Arthritis Patients. *DNA Research.* 2006;13(4):169-83.
160. Richardson A, Schwager F, Landry S, Georgopoulos C. The importance of a mobile loop in regulating chaperonin/ co-chaperonin interaction: humans versus *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2001;276(7):4981-7.
161. Cuesta R, Laroia G, Schneider R. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* 2000;14(12):1460-70.
162. Chakraborty S, Joshi P, Shanker V, Ansari ZA, Singh SP, Chakrabarti P. Contrasting Effect of Gold Nanoparticles and Nanorods with Different Surface Modifications on the Structure and Activity of Bovine Serum Albumin. *Langmuir.* 2011;27(12):7722-31.
163. Park B-C, Shen X, Samaraweera M, Yue BYJT. Studies of Optineurin, a Glaucoma Gene: Golgi Fragmentation and Cell Death from Overexpression of Wild-Type and Mutant Optineurin in Two Ocular Cell Types. *The American journal of pathology.* 2006;169(6):1976-89.
164. Mukherjee S, Chiu R, Leung S-M, Shields D. Fragmentation of the Golgi Apparatus: An Early Apoptotic Event Independent of the Cytoskeleton. *Traffic.* 2007;8(4):369-78.
165. Jokar M, Rahman RA, Ibrahim NA, Abdullah LC, Ping TC. Characterization and Biocompatibility Properties of Silver Nanoparticles Produced Using Short Chain Polyethylene Glycol. *Journal of Nano Research.* 2010;10:29-37.
166. Yu M, Huang SH, Yu KJ, Clyne AM. Dextran and Polymer Polyethylene Glycol (PEG) Coating Reduce Both 5 and 30 nm Iron Oxide Nanoparticle Cytotoxicity in 2D and 3D Cell Culture. *International Journal of Molecular Sciences.* 2012;13(5):5554-70.
167. Arakawa T. Superoxide generative reaction in insect haemolymph and its mimic model system with surfactants in vitro. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 1995;25(2):247-53.

168. Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*. 2010;12(5):1531-51.
169. Buhrke T, Lengler I, Lampen A. Analysis of proteomic changes induced upon cellular differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *Development Growth & Differentiation*. 2011;53(3):411-26.
170. Antony JJ, Sithika MAA, Joseph TA, Suriyakalaa U, Sankarganesh A, Siva D, et al. In vivo antitumor activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Ficus religiosa* as a nanofactory in DAL induced mice model. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2013;108:185-90.
171. Prabhu D, Arulvasu C, Babu G, Manikandan R, Srinivasan P. Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. *Process Biochemistry*. 2013;48(2):317-24.
172. Clemons NJ, Buzzard K, Steel R, Anderson RL. Hsp72 Inhibits Fas-mediated Apoptosis Upstream of the Mitochondria in Type II Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(10):9005-12.
173. Hua G, Zhang Q, Fan Z. Heat Shock Protein 75 (TRAP1) Antagonizes Reactive Oxygen Species Generation and Protects Cells from Granzyme M-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(28):20553-60.
174. Sidler D, Brockmann A, Mueller J, Nachbur U, Corazza N, Renzulli P, et al. Thiazolide-induced apoptosis in colorectal cancer cells is mediated via the Jun kinase-Bim axis and reveals glutathione-S-transferase P1 as Achilles' heel. *Oncogene*. 2012;31(37):4095-106.
175. Satapathy SR, Mohapatra P, Preet R, Das D, Sarkar B, Choudhuri T, et al. Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53. *Nanomedicine*. 2013;8(8):1307-22.
176. Friedmann E, Hauben E, Maylandt K, Schlegeler S, Vreugde S, Lichtenthaler SF, et al. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNF[alpha] in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol*. 2006;8(8):843-8.
177. Karakoti AS, Singh S, Kumar A, Malinska M, Kuchibhatla SVNT, Wozniak K, et al. PEGylated Nanoceria as Radical Scavenger with Tunable Redox Chemistry. *J Am Chem Soc*. 2009;131(40):14144-5.
178. Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO reports*. 2002;3(5):420-5.
179. Saaf AM, Halbleib JM, Chen X, Yuen ST, Leung SY, Nelson WJ, et al. Parallels between global transcriptional programs of polarizing caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer. *Molecular Biology of the Cell*. 2007;18(11):4245-60.
180. Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, et al. Expression of L1-CAM and ADAM10 in Human Colon Cancer Cells Induces Metastasis. *Cancer Res*. 2007;67(16):7703-12.
181. Yeh C, Wang J, Cheng T, Juan C, Wu C, Lin S. Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. *Cancer Lett*. 2006;233(2):297-308.
182. Laurell H, Bouisson M, Berthelemy P, Rochaix P, Dejean S, Besse P, et al. Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *World J Gastroenterol*. 2006;12(21):3344-51.
183. Lee I, Chen C, Sheu J, Lee H, Huang G, Yu C, et al. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005;4(6):2062-9.
184. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri R, Auer H, Martin E, De La Chapelle A, et al. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene*. 2004;23(44):7366-77.
185. Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, et al. Expression of L1-CAM and ADAM10 in Human Colon Cancer Cells Induces Metastasis. *Cancer Research*. 2007;67(16):7703-12.
186. Thomas XG, Campos L, Mounier C, Cornillon J, Piselli S, Le Q-H, et al. Expression of heat-shock proteins (HSPs) in acute myeloid leukemia (AML). *AACR Meeting Abstracts*. 2004;2004(1):1021-b.
187. Wang A-G, Yoon SY, Oh J-H, Jeon Y-J, Kim M, Kim J-M, et al. Identification of intrahepatic cholangiocarcinoma related genes by comparison with normal liver tissues using expressed sequence tags. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;345(3):1022-32.

188. Nishida N, Nagahara M, Sato T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, et al. Microarray Analysis of Colorectal Cancer Stromal Tissue Reveals Upregulation of Two Oncogenic miRNA Clusters. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(11):3054-70.
189. Tripathi A, King C, de la Morenas A, Perry V, Burke B, Antoine G, et al. Gene expression abnormalities in histologically normal breast epithelium of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2008;122(7):1557-66.
190. Bleeker F, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop W, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat*. 2009;30(1):7-11.
191. Kim M, Chang X, Nagpal J, Yamashita K, Baek J, Dasgupta S, et al. The N-methyl-D-aspartate receptor type 2A is frequently methylated in human colorectal carcinoma and suppresses cell growth. *Oncogene*. 2008;27(14):2045-54.
192. Jinushi M, Vanneman M, Munshi N, Tai Y, Prabhala R, Ritz J, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1285-90.
193. Barbieri C, Baca S, Lawrence M, Demichelis F, Blattner M, Theurillat J, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*. 2012;44(6):685-9.
194. Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu L-L, Sethi SK, Koay ESC. Proteomic Study Reveals That Proteins Involved in Metabolic and Detoxification Pathways Are Highly Expressed in HER-2/neu-positive Breast Cancer*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005;4(11):1686-96.
195. Oue N, Hamai Y, Mitani Y, Matsumura S, Oshimo Y, Aung PP, et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: Identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Research*. 2004;64(7):2397-405.
196. Twine N, Stover J, Marshall B, Dukart G, Hidalgo M, Stadler W, et al. Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(18):6069-75.
197. Yokoe T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Ohmachi T, Kusunoki M, et al. Efficient identification of a novel cancer/testis antigen for immunotherapy using three-step microarray analysis. *Cancer Res*. 2008;68(4):1074-82.
198. Daugaard M, Kirkegaard-Sørensen T, Ostensfeld MS, Aaboe M, Høyer-Hansen M, Ørntoft TF, et al. Lens Epithelium-Derived Growth Factor Is an Hsp70-2 Regulated Guardian of Lysosomal Stability in Human Cancer. *Cancer Research*. 2007;67(6):2559-67.
199. Schmid M, Carson D. *Cell Cycle Regulation and Hematological Disorders*. 2001.
200. Lauer C, Volkl A, Riedl S, Fahimi HD, Beier K. Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma. *Carcinogenesis*. 1999;20(6):985-9.
201. Gagne F, Auclair J, Turcotte P, Gagnon C. Sublethal Effects of Silver Nanoparticles and Dissolved Silver in Freshwater Mussels. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*. 2013;76(8):479-90.
202. Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(10):6979-84.
203. Bohmert L, Hansen U, Girod M, Knappe P, Niemann B, Thunemann A, et al. Cytotoxicity of AgPure silver nanoparticles in the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology Letters*. 2011;205:S280-S.

10 Anhang

10.1 Tabellen

Tabelle 10 Hochregulierte Proteine der AgPure Behandlungsgruppen

Behandlungsgruppe	Protein Beschreibung	Funktion	Mowse Score	FC	Uniprot ID
AgPure 25 µg mL ⁻¹	Zinc finger protein 732	Transkriptions Regulator	63	3,79	B4DXR9
	Heat shock protein beta-7	Chaperon	48	2,47	Q9UBY9
	Creatine kinase B-type	Kinase	241	2,42	P12277
	Heat shock 70 kDa protein 1	Chaperon	183	2,42	P08107
	Elongation factor 2	Kinase	185	1,837	O00418
	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Chaperon	131	1,727	P10809
	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Chaperon	95	1,722	Q12931
	Serpin B7	Regulierung der Proteolyse	47	1,703	O75635
	GMP synthase	Enzym	70	1,577	P49915
	FK506-binding protein 4	Kinase	48	1,563	Q92790
	RIB43A-like with coiled coils protein 2	unbekannt	57	1,544	Q9H4K1
	26S protease regulatory subunit S10B	Peptidase	130	1,512	P62333
	14-3-3 Protein beta/alpha	Transkriptionsregulator	120	1,511	P31946
	Putative Ribosomal RNA large subunit methyltransferase 2	Enzym	71	1,504	Q9UI43
	FK506-binding protein 4	Kinase	71	1,473	Q92790
	Zinc finger protein 34	Transkriptionsregulator	62	1,468	Q9H4K1
	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	Enzym	62	1,466	P43304
	Heat shock 70 kDa protein 1L	Chaperon	179	1,450	P34931
	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Enzym	72	1,447	P05091
	Proteasome subunit beta type 3	Peptidase	49	1,431	P49720
	Developmentally regulated GTP-binding protein 2	Signaltransduktion	44	1,425	P55039
	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Translationsregulator	90	1,404	Q13347
	Thioredoxin domain-containing protein 5	Elektronentransfer	60	1,99	TXND5
	Actin-related protein 3	ATP-Bindung	187	1,48	ARP3
Keratin, type II cytoskeletal 8	Zytokeratin	275	2,54	K2C8	

	GMP synthase	Enzym	152	1,75	GUAA
	Liver carboxylesterase 1	Enzym	184	1,6	EST1
	Zinc finger protein 468	Transkriptionsregulator	55	1,44	ZN468
	Catalase	Enzym	78	1,4	CATA
	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	Enzym	185	1,84	DDX3X
	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase1	Transport	118	2,36	PNPT1
	Annexin A6	Calciumionenbindung	118	1,54	ANXA6
	Cytosol aminopeptidase	Enzm	203	1,45	AMPL
	Tudor domain-containing protein PHF20L1	Zinkionenbindung	65	1,51	A8MW92
AgPure 2.5 µg mL ⁻¹	Ras-related protein Rab-30	Enzym	38	2,049	Q15771
	Polymerase delta-interacting protein 2	DNA-Bindung	110	1,778	Q9Y2S7
	Serpin B7	Proteolyseregulator	43	1,618	O75635
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	RNA Bindung	91	1,564	P14866
	40s ribosomal protein S4, X isoform	Positive Regulation der Proliferation	36	1,403	P62701
	Chaperon containing TCP1, subunit 7	Chaperon	125	1,460	Q99832
	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase1	Transport	118	1,98	PNPT1
	ATP-citrate synthase	Enzym	40	1,400	P53396
AgPure 25 µg mL ⁻¹ und AgPure 2.5 µg mL ⁻¹	Cytokeratin 18	Zytokeratin	112	2,48 / 1,75	P05783
	Optineurin	Signaltransduktion	81	2,36 / 1,98	P13639
	Elongation factor 2	Translationsregulator	189	1,82 / 2,08	Q96CV9

Tabelle 11 Hochregulierte Tabellen der Silbernitrat Behandlungsgruppen

Behandlungsgruppe	Protein Beschreibung	Funktion	Mowse Score	FC	Uniprot ID
AgNO ₃ 5 µg mL ⁻¹	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Enzym	233	2,32	P00367
	Kinesin heavy chain isoform 5A	ATP Bindung	45	1,71	Q12840
	phosphoglycerate kinase 1	Phosphoprotein	126	1,64	P00558
	Heat shock 70 kDa protein 1B	Chaperon	104	1,56	P08107
	Tax1-binding protein 1 homolog	Apoptose	85	1,46	Q86VP1

	Tubulin beta-2C chain OS	GTP Bindung	137	1,43	P68371
	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Chaperon	82	1,42	P10809
	Protein disulfide-isomerase A6	Chaperon	161	1,42	Q15084
	Ras related protein Rab-1A	Proteintransport	43	1,433	P62820
	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Enzym	118	1,418	P31040
	NSFL1 cofactor p47	Lipid Bindung	110	1,417	Q9UNZ2
	Thioredoxin domain-containing protein 5	Elektronentransfer	60	2,2	TXND5
	Actin-related protein 3	ATP-Bindung	187	1,43	ARP3
	Keratin, type II cytoskeletal 8	Zytokeratin	275	1,57	K2C8
	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	Enzym	185	1,55	DDX3X
	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	Transport	118	1,58	PNPT1
AgNO ₃ 0.5 µg mL ⁻¹	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Enzym	142	2,018	P00367
	Keratin, type II cytoskeletal 1	Zytokeratin	106	1,735	P04264
	Chain B, Human Branched-Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase	Enzym	146	1,591	P11182
	Glutamine synthetase	Enzym	52	1,538	P15104
	Far upstream element-binding protein 2	Transkriptionsregulator	121	1,536	Q92945
	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	Chaperon	149	1,447	Q12931
	Plastin-2	Calciumionenbindung	125	1,406	P13796
	Liver carboxylesterase 1	Enzym	184	1,7	EST1
	Zinc finger protein 468	Transkriptionsregulator	55	1,67	ZN468
	Catalase	Enzym	78	1,45	CATA
	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	Enzym	185	1,63	DDX3X

	Annexin A6	Calciumionenbindung	118	1,53	ANXA6
	Cytosol aminopeptidase	enzyme	203	1,42	AMPL
AgNO ₃ 5 µg mL ⁻¹ und AgNO ₃ 0,5 µg mL ⁻¹	Elongation factor 2	GTP Bindung	189	1,558	P13639
	Acyl-coenzyme A thioesterase 1	Enzym	75	1,753	Q86TX2
	Optineurin	Signaltransduktion	81	1,700	Q96CV9
	Keratin, type 1 cytoskeletal 18	Zytokeratin	349	1,578	P05783
	Acyl-coenzyme A synthetase family member 2	Enzym	230	1,705	Q96CM8
	Phenylalanine-tRNA ligase subunit beta	Enzym	140	1,528	Q9NSD9
	Aconitate hydratase	Enzym	104	1,547	Q99798
	Keratin, type II, cytoskeletal 1	Zytokeratin	68	1,741	P04264

Tabelle 12 Herunterregulierte Proteine der AgPure Behandlungsgruppen.

Behandlungsgruppe	Protein Beschreibung	Funktion	Mowse Score	FC	Uniprot ID
AgPure 25 µg mL ⁻¹	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate	Enzym	71	-1,41	P36957
	GTP-binding protein SAR1a	Proteintransport	135	-1,41	Q9NR31
	Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	Chaperon	71	-1,41	P48643
	KIAA0193	Proteolyse	54	-1,41	Q12765
	CGI-52 protein	Transport	72	-1,41	Q9Y365
	Esterase D/formylglutathione hydrolase	Enzym	81	-1,42	P10768
	Growth factor receptor-bound protein 2 isoform 1	SH3-Domänen Bindung	130	-1,42	P62993
	Glyoxylase domain-containing protein 4	Enzym	136	-1,42	Q9Y3E8
	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha) (65 kDa antigen)	Chaperon	122	-1,43	P17987
	Pre-mRNA-processing factor 6	DNA Bindung	83	-1,43	Q94906

FAST kinase domain-containing protein 3	Kinase	37	-1,43	Q14CZ7
Tu translation elongation factor, mitochondrial	GTP Bindung	191	-1,44	P49411
D-lactate dehydrogenase isoform 2 precursor	Enzym	92	-1,45	Q86WU2
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	RNA Bindung	121	-1,45	O60506
Phosphoserine phosphatase	Enzym	134	-1,45	P78330
glutathione S-transferase-P1c	Enzym	146	-1,45	P09211
Mitochondrial inner membrane protein	Membranprotein	61	-1,46	Q3B7X4
Rab GDP dissociation inhibitor beta	Proteintransport	150	-1,46	P50395
sorcini isoform a	Calcium-Bindung	48	-1,47	P30626
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Ionentransport	69	-1,47	P45880
Apolipoprotein E	Lipidtransport	74	-1,47	P02649
Purine nucleoside phosphorylase	Enzym	115	-1,47	P00491
Cytosol aminopeptidase	Enzym	166	-1,48	P28838
Peregrin	Transkriptionsregulator	45	-1,48	P55201
Thiosulfate sulfurtransferase	Enzym	108	-1,49	Q16762
F-actin-capping protein subunit beta	Actin Bindung	133	-1,49	P47756
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Enzym	48	-1,5	P54578
Pre-mRNA-splicing factor SPF27	mRNA Prozessierung	78	-1,51	O75934
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	Ionentransport	81	-1,52	Q6NUK1
Homeobox protein Hox-B4	Transkriptionsregulator	38	-1,52	P17483
Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	Enzym	52	-1,52	P49588
Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Enzym	77	-1,52	P45954
Thiosulfate sulfurtransferase	Enzym	108	-1,53	Q16762
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Enzym	64	-1,54	P13716
Keratin, type I cytoskeletal 19	Zytokeratin	79	-1,54	P08727
Cytosol aminopeptidase	Enzym	82	-1,54	P28838
Enoyl-CoA hydratase,	Enzym	69	-1,56	P30084

mitochondrial				
Annexin A7	Calcium Bindung	88	-1,58	P20073
Cartilage intermediate layer protein 1	Immunglobulin Domänen Signalgeber	39	-1,59	O75339
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 15	Ion transport	35	-1,6	Q99712
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Enzym	100	-1,61	Q13011
Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B	Transkriptionsregulator	81	-1,62	Q9NQG5
Glutathione transferase omega-1	Enzym	66	-1,65	P78417
Annexin A5	Calcium Bindung	105	-1,65	P08758
Progesterone-induced-blocking factor 1	Progesteronmediator	38	-1,66	Q8WXW3
Annexin A4	Calcium Bindung	149	-1,68	P09525
Programmed cell death 6-interacting protein	Zelltod	53	-1,72	Q8WUM4
Scavenger mRNA-decapping Enzym DcpS	Enzym	157	-1,77	Q96C86
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain precursor	Enzym	69	-1,78	E5KSD5
mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor	Enzym	166	-1,84	P30084
glutathione S-transferase-P1c	Enzym	188	-1,9	P09211
isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha precursor	Enzym	167	-1,91	P50213
annexin IV	Calcium Bindung	220	-1,91	P09525
Cell death activator CIDE-B	Apoptose	56	-1,96	Q9UHD4
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Enzym	157	-1,98	P25325
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Enzym	411	-2,01	P04181
Regucalcin	Cacliumtransport	48	-2,04	Q15493
Sec1 family domain-containing protein 1	Proteintransport	40	-2,11	Q8WVM8
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Enzym	87	-2,18	O75874
calreticulin	Calciumtransport	52	-1,41	P27797
Endophilin-B1	Apoptose	29	-1,92	SHLB1
SH3 adapter protein SPIN90	Protein Bindung	35	-1,82	SPN90
T-complex protein 1 subunit theta	ATP Bindung	68	-2,2	TCPQ

	L-lactate dehydrogenase B chain	Enzym	85	-1,45	LDHB
	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	Enzym	72	-1,43	SUCB1
	Serine protease HTRA2, mitochondrial	Enzym	74	-1,7	HTRA2
	Mitogen-activated protein kinase MLT	ATP Bindung	61	-1,45	MLTK
	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Enzym	52	-2,17	ECHM
	RAB GTPase-activating protein 1-like	Enzym	46	-2,13	RBG1L
	Thiosulfate sulfurtransferase	Enzym	59	-2,08	THTR
	Proteasome subunit alpha type-2	Apoptose	108	-1,49	PSA2
	Polymerase delta-interacting protein 2	DNA Bindung	146	-1,49	PDIP2
AgPure 2.5 µg mL ⁻¹	Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-1	Ionentransport	62	-1,42	Q12879
	quinolinate phosphoribosyl transferase	Enzym	86	-1,43	Q15274
	similar to lysophospholipase		76	-1,44	Q5VWZ2
	ADP-ribosylation factor interacting protein 1 isoform 1	Proteintransport	68	-1,49	P84077
	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase,	Enzym	44	-1,51	Q99447
	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	Enzym	53	-1,52	P15559
	Exosome complex exonuclease RRP42	Enzym	69	-1,56	Q15024
	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Enzym	82	-1,57	O95865
	keratin 1, type II, cytoskeletal	Zytokeratin	101	-1,57	P08729
	Keratin, type I cytoskeletal 10	Zytokeratin	112	-1,58	P13645
	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein precursor	Enzym	128	-1,6	P31040
	tumor rejection antigen (gp96) 1	Zytoskelett	176	-1,96	P35527
	Keratin, type 1, cytoskeletal 9	Zytokeratin	78	-1,86	Q5CAQ5
	SH3 adapter protein SPIN90	Protein Bindung	35	-1,89	SPN90
	T-complex protein 1 subunit theta	ATP Bindung	68	-1,67	TCPQ

AgPure 25 µg mL ⁻¹ und AgPure 2.5 µg mL ⁻¹	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Enzym	52	-1,45	ECHM
	Enoyl-CoA hydratase	Enzym	40	-2,2	P30084
	Aldose 1-epimerase	Enzym	65	-1,7	Q96C23
	Zinc finger protein 658	Transkriptionsregulator	54	-2,71	Q5TYW1
	Heat shock protein beta-7	Chaperon	60	-1,59	P35385
	Putative ankyrin repeat domain-containing protein 26	unbekannt	34	-2,17	Q6NSI1
	DnaJ homolog subfamily C member 15	Chaperon	39	-2,4	Q9Y5T4
	PTB domain-containing engulfment adapter protein 1	Apoptose	55	-2	Q9UBP9
	T-complex protein 1 subunit theta	Chaperon	169	-2,23	P50990
	cAMP-dependent protein kinase type II alpha regulatory subunit	cAMP Bindung	77	-1,78	P13861
	Keratin, type II cytoskeletal 1	Zytokeratin	57	-1,81	P04264
	ADP-sugar pyrophosphatase	Enzym	84	-1,67	Q9UKK9

Tabelle 13 Herunterregulierte Proteine der Silbernitrat Behandlungsgruppen

Behandlungsgruppe	Protein Beschreibung	Funktion	Mowse Score	FC	Uniprot ID
AgNO ₃ 5 µg mL ⁻¹	Elongation factor 1-gamma		112	-1,47	P26641
	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial	Enzym	73	-1,52	Q9NUB1
	Heat shock protein HSP 90-alpha	Chaperon	60	-1,63	P07900
	Keratin, type 1 cytoskeletal 9	Zytokeratin	125	-1,64	P535527
	T-complex protein 1 subunit theta	ATP Bindung	68	-1,45	TCPQ
	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	Enzym	72	-1,49	SUCB1
	Serine protease HTRA2, mitochondrial	Enzym	74	-1,56	HTRA2
	Mitogen-activated	ATP Bindung	61	-1,92	MLTK

	protein kinase MLT				
	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Enzym	52	-1,49	ECHM
	Thiosulfate sulfurtransferase	Enzym	59	-1,45	THTR
	Polymerase delta-interacting protein 2	DNA Bindung	146	-1,64	PDIP2
	Tudor domain-containing protein PHF20L1	Zinkionen Bindung	65	1,43	A8MW92
AgNO ₃ 0.5 µg mL ⁻¹	Histone-lysine N-methyltransferase	Enzym	72	-1,56	Q96L73
	WD repeat-containing protein 12	Ribosom Biogenese	70	-1,72	Q9GZL7
	Zinc finger protein 658B	Signaltransduktion	62	-2,78	Q4V348
	Endophilin-B1	Apoptose	29	-1,56	SHLB1
	SH3 adapter protein SPIN90	Protein Bindung	35	-1,52	SPN90
	T-complex protein 1 subunit theta	ATP Bindung	68	-1,67	TCPQ
	L-lactate dehydrogenase B chain	Enzym	85	-1,47	LDHB
	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Enzym	52	-1,59	ECHM
	RAB GTPase-activating protein 1-like	Enzym	46	-1,49	RBG1L
	Proteasome subunit alpha type-2	Apoptose	108	-1,41	PSA2
AgNO ₃ 5 µg mL ⁻¹ und AgNO ₃ 0.5 µg mL ⁻¹	Acyl-CoA-binding protein	Transport	44	-1,9	P07108
	Keratin, type 1 cytoskeletal 9	Zytokeratin	88	-2,38	P35527
	ADP sugar pyrophosphatase	Enzym	84	-1,79	Q9UUKK9
	Aldose 1-epimerase	Enzym	65	-1,48	Q96C23
	Methylosome subunit pICln	Transport	46	-1,67	P54105
	PCTP-like protein	Lipidtransport	55	-1,58	Q9Y365
	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	cAMP Bindung	77	-2,16	P13861
	Zinc finger pro-	Transkriptionsregulator	55	-1,47	Q2M3W8

	tein 181				
	Protein disulfide-isomerase A3	Enzym	104	-1,93	P30101
	G-rich sequence factor 1	mRNA Bindung	47	-1,48	Q12849
	T-complex protein 1 subunit theta	ATP Bindung	92	-1,44	P50990
	Glutathione S-transferase P	Enzym	153	-2,16	P09211

10.2 Abbildungen

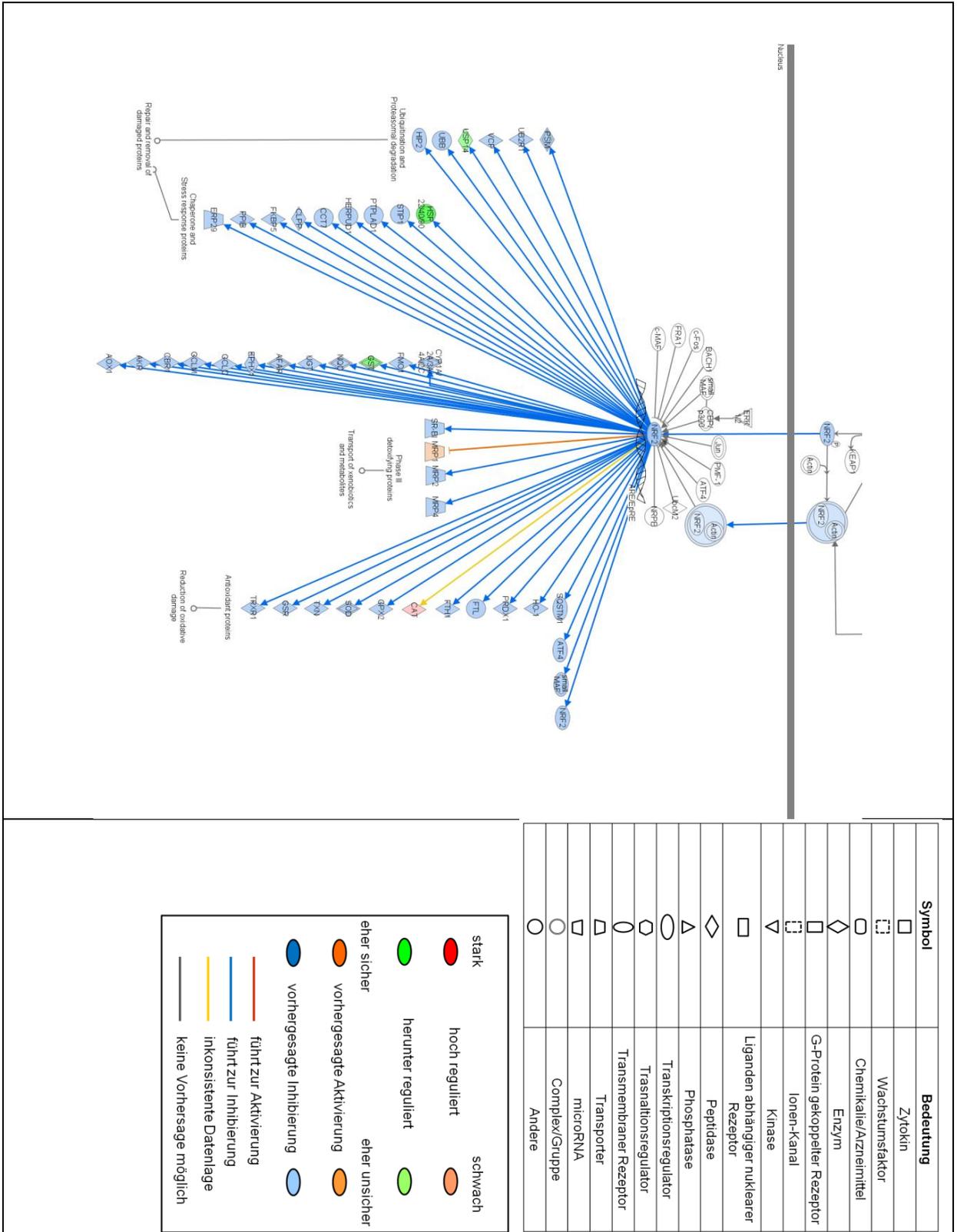


Abbildung 54: Ausschnitt aus dem Signalweg *Nrf2 Mediated Oxidative Stress Response* für beide NP-Gruppen. Dieser Ausschnitt wurde gewählt, weil in ihm die experimentell ermittelten deregulierten Proteine zu finden sind. Die IPA-Daten deuten in diesem Fall auf eine Inhibierung des Signalweges bzw. enthaltener relevanter Funktionen hin.

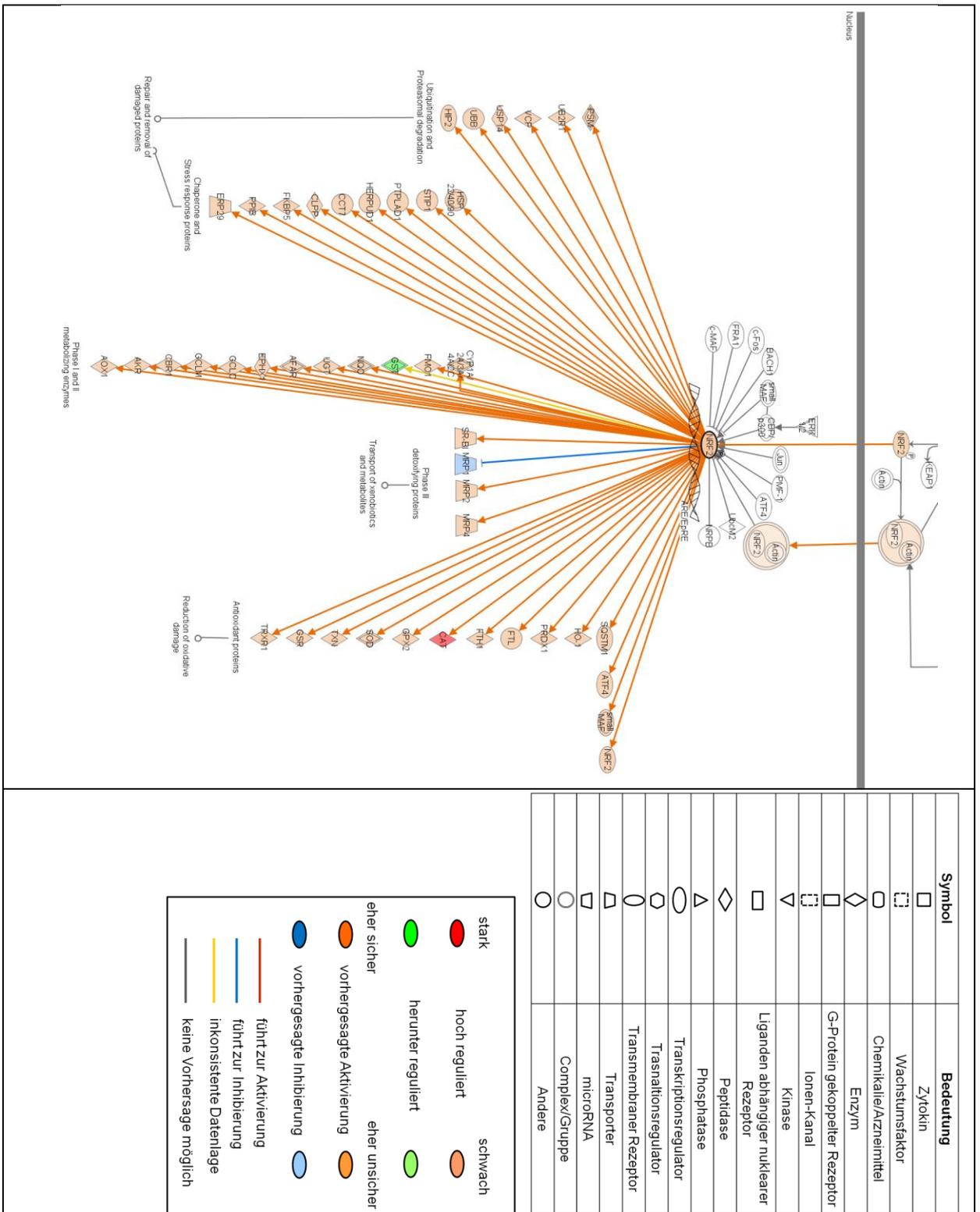
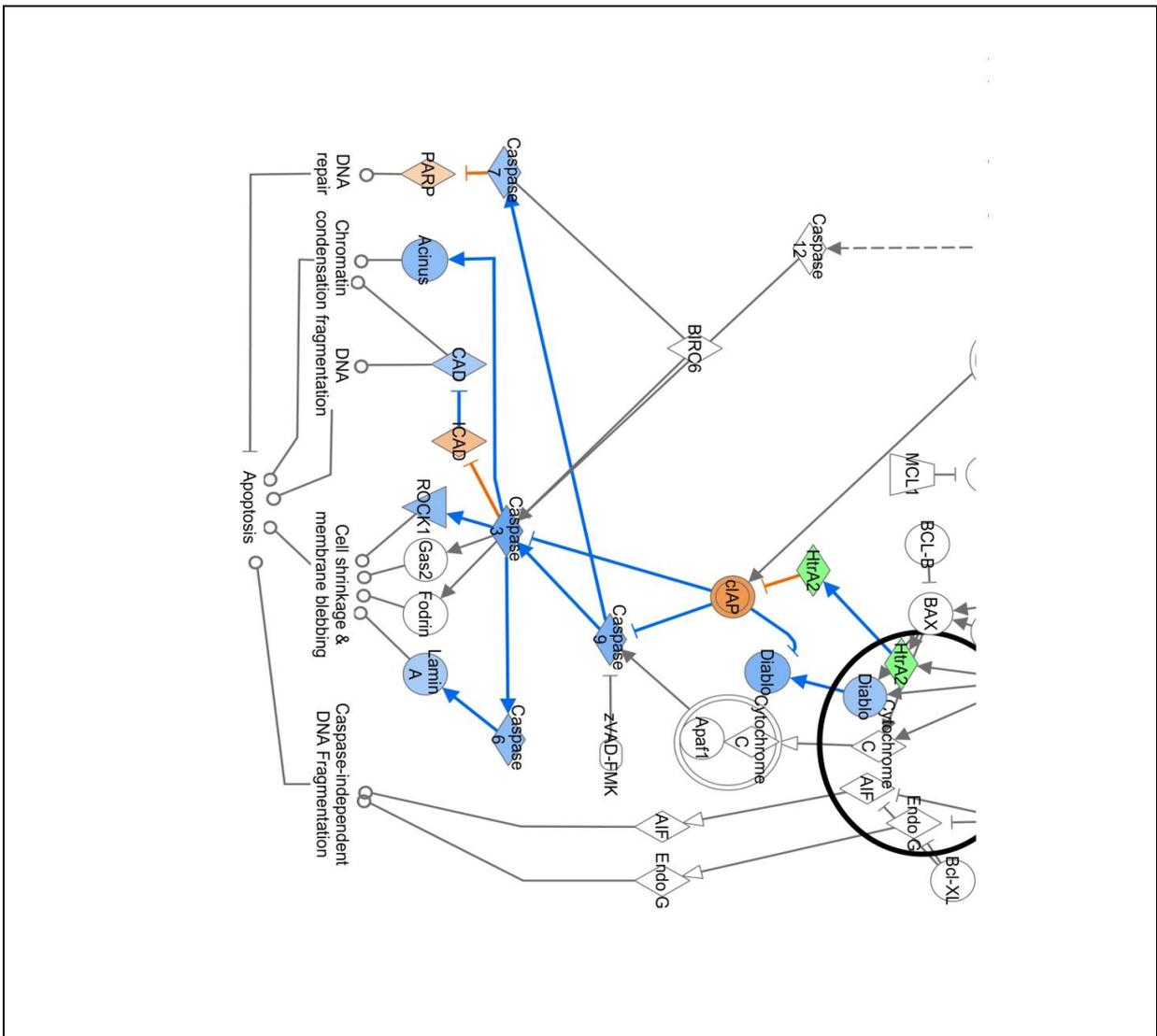


Abbildung 55: Ausschnitt aus dem Signalweg *Nrf2 Mediated Oxidative Stress Response* für beide SN-Gruppen. Dieser Ausschnitt wurde gewählt, weil in ihm die experimentell ermittelten deregulierten Proteine zu finden sind. Die IPA Daten deuten in diesem Fall auf eine Aktivierung des Signalweges bzw. relevanter enthaltener Funktionen hin.



Symbol	Bedeutung
□	Zytokin
□	Wachstumsfaktor
□	Chemikalie/Arzneimittel
◇	Enzym
□	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
▽	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
◇	Peptidase
△	Phosphatase
○	Transkriptionsregulator
○	Transkriptionsregulator
○	Transmembraner Rezeptor
▽	Transporter
○	microRNA
○	Complex/Gruppe
○	Anderer

● (rot)	stark	● (orange)	schwach
● (grün)	hoch reguliert	● (hellgrün)	herunter reguliert
● (blau)	eher sicher	● (orange)	eher unsicher
● (orange)	vorhergesagte Aktivierung	● (blau)	vorhergesagte Inhibierung
— (rot)	führt zur Aktivierung	— (blau)	führt zur Inhibierung
— (gelb)	inkonsistente Datenlage	— (schwarz)	keine Vorhersage möglich

Abbildung 56 Ausschnitt aus dem Apoptose Signaltransduktionsweg für Ap25 und SN5, der die Inhibierung der Caspasen 3, 6, 7 und 9 und damit die Inhibierung der Apoptose voraussagt. Dieser Ausschnitt des Signalweges wurde gewählt, da in ihm die experimentell ermittelten deregulierten Proteine zu erkennen sind. Die meisten an der Apoptose beteiligten Prozesse sind inhibiert und damit prognostiziert IPA ebenfalls die Inhibierung des Signalweges.

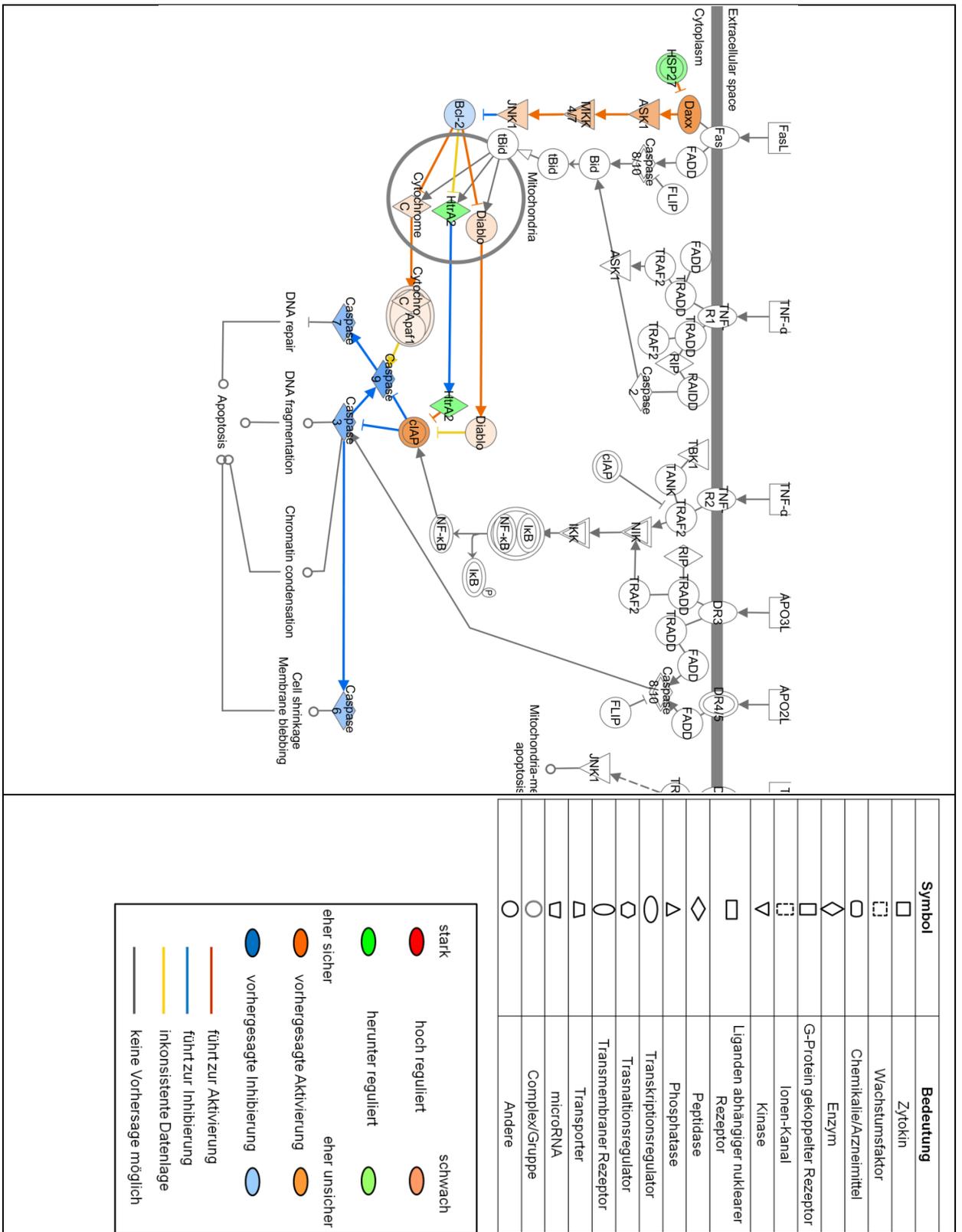


Abbildung 57: Ausschnitt aus dem Fasl-Signalweg für AP25. Die IPA-Prognose sieht eine Inhibierung der Caspasen 3, 6, 7 und 9 vor und damit eine Inhibierung des gesamten Signalweges.

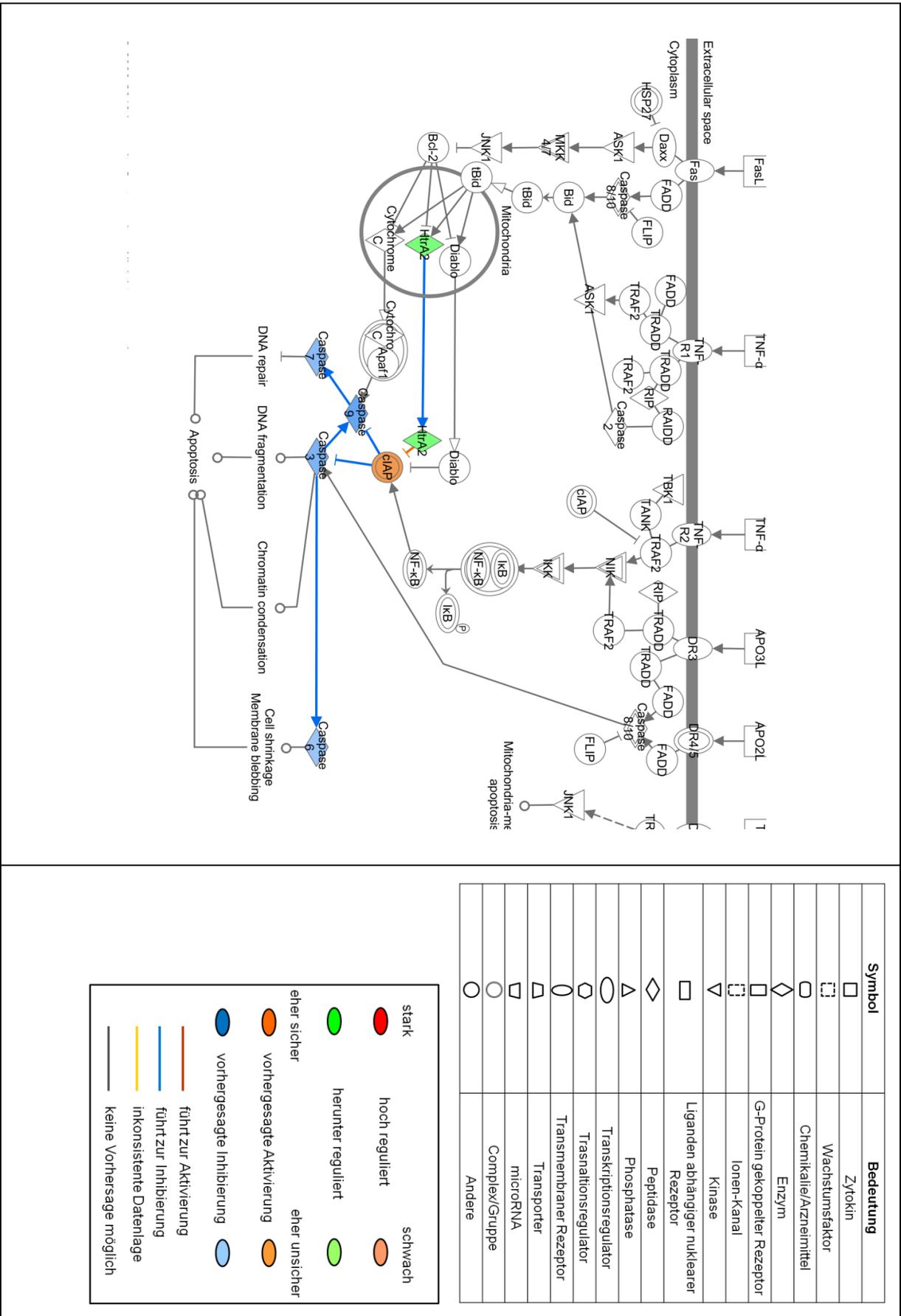
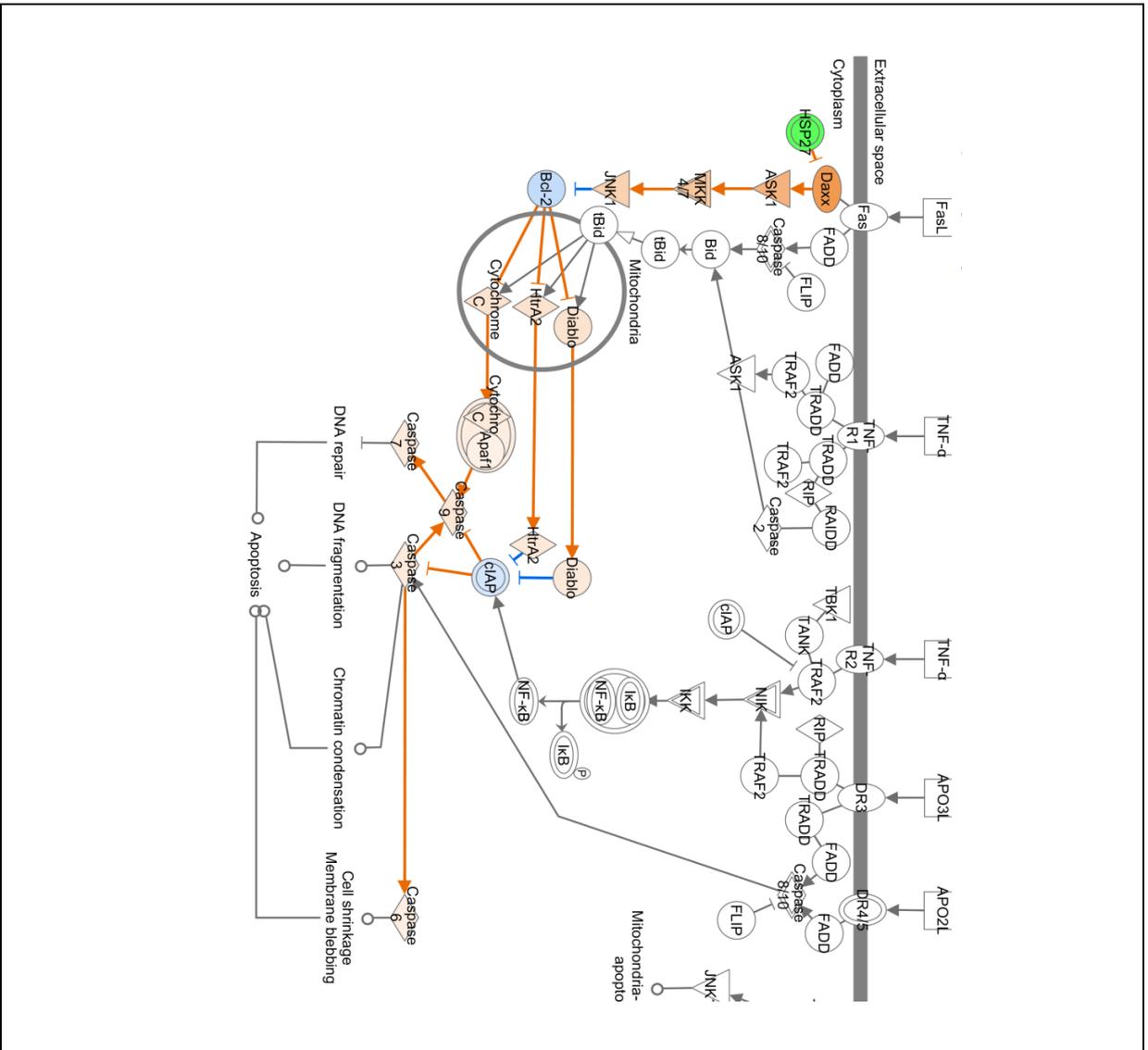


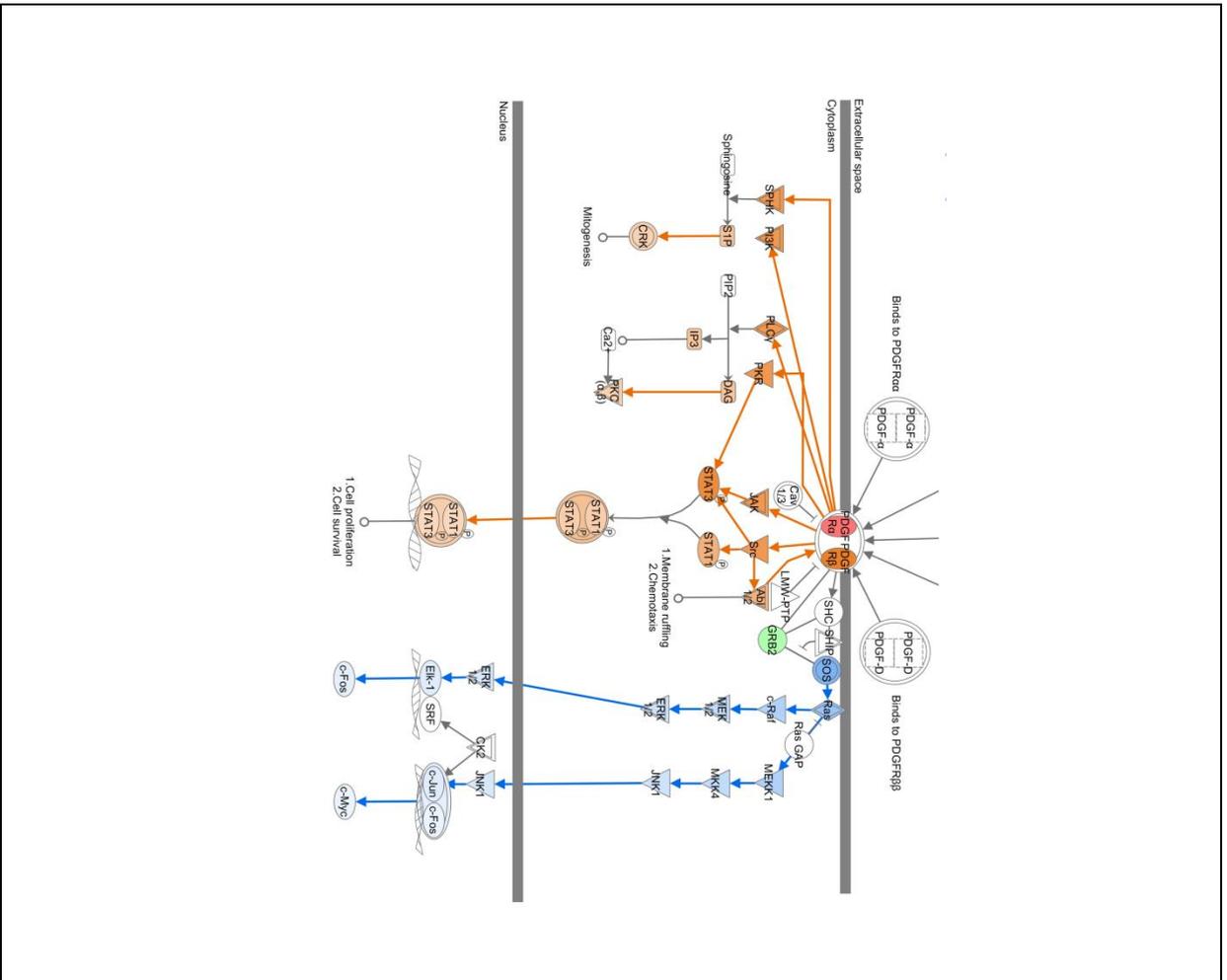
Abbildung 58: Ausschnitt aus dem FasL-Signalweg für SN5. Die IPA-Prognose sieht eine Inhibierung der Caspasen 3, 6, 7 und 9 vor und damit eine Inhibierung des gesamten Signalweges.



Symbol	Bedeutung
□	Zytokin
□	Wachstumsfaktor
□	Chemikalie/Azneimittel
□	Enzym
□	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
□	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
□	Peptidase
□	Phosphatase
□	Transkriptionsregulator
□	Transaktionsregulator
□	Transmembraner Rezeptor
□	Transporter
□	microRNA
□	Complex/Gruppe
○	Andere

stark	hoch reguliert	schwach
herunter reguliert	eher unsicher	
eher sicher	vorhergesagte Aktivierung	
vorhergesagte Inhibierung		
führt zur Aktivierung		
führt zur Inhibierung		
inkonsistente Datenlage		
keine Vorhersage möglich		

Abbildung 59 Ausschnitt aus dem FasL-Signalweg für AP2.5. Die IPA-Prognose sieht eine leichte Aktivierung der Caspasen 3, 6, 7 und 9 vor und damit eine Aktivierung des gesamten Signalweges.



Symbol	Bedeutung
□	Zytokin
□	Wachstumsfaktor
□	Chemikalie/Arzneimittel
◇	Enzym
□	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
▽	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
◇	Peptidase
△	Phosphatase
○	Transkriptionsregulator
○	Transaktionsregulator
○	Transmembraner Rezeptor
○	Transporter
○	microRNA
○	Complex/Gruppe
○	Andere

stark	hoch reguliert	schwach
herunter reguliert	eher unsicher	
eher sicher	vorhergesagte Aktivierung	
vorhergesagte Inhibierung		
	führt zur Aktivierung	
	führt zur Inhibierung	
	inkonsistente Datenlage	
	keine Vorhersage möglich	

Abbildung 60 Ausschnitt aus dem *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)-Signalweg für AP25. IPA prognostiziert die Aktivierung des Signalweges und damit der Funktion *Cell Survival*.

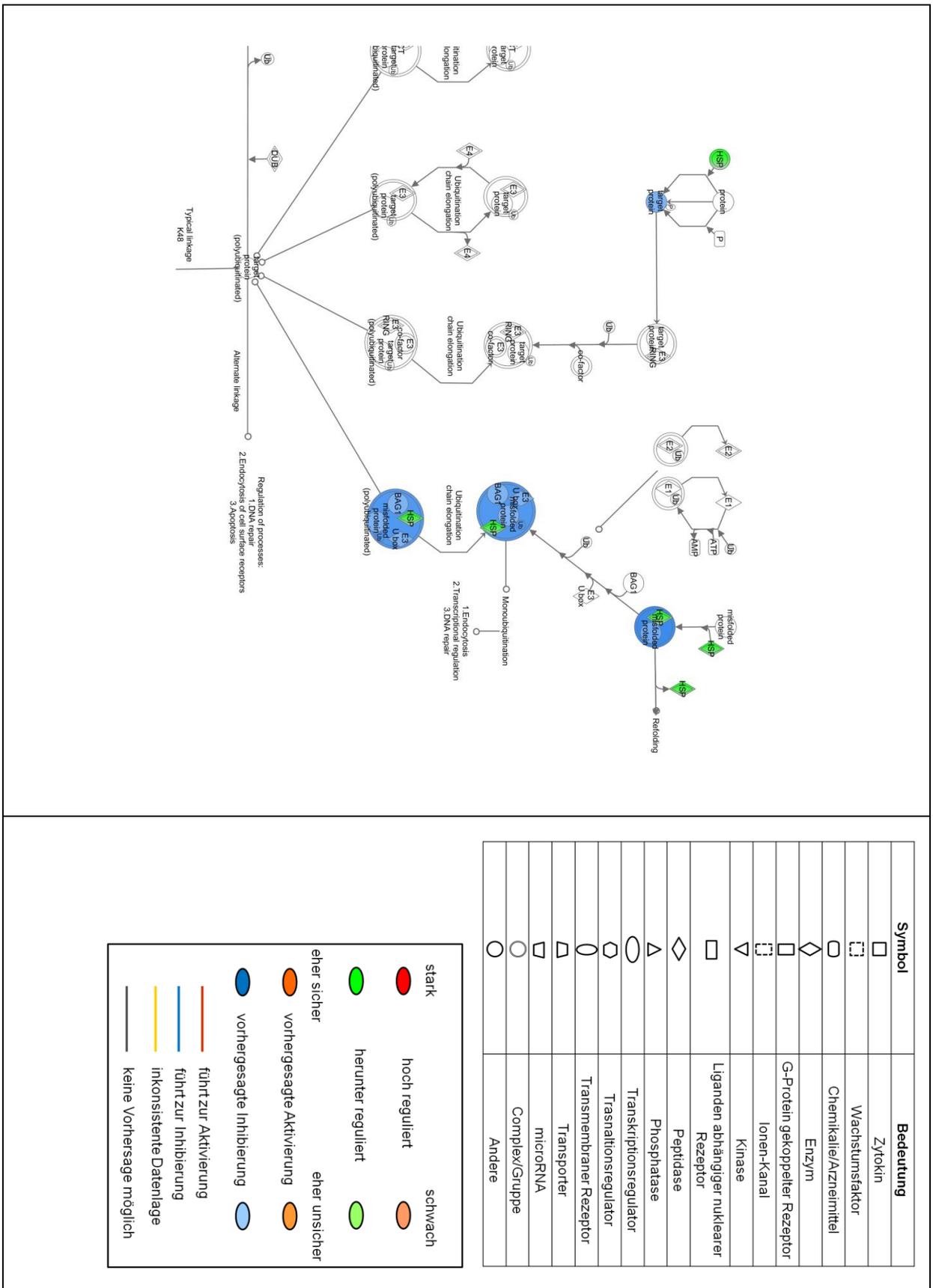
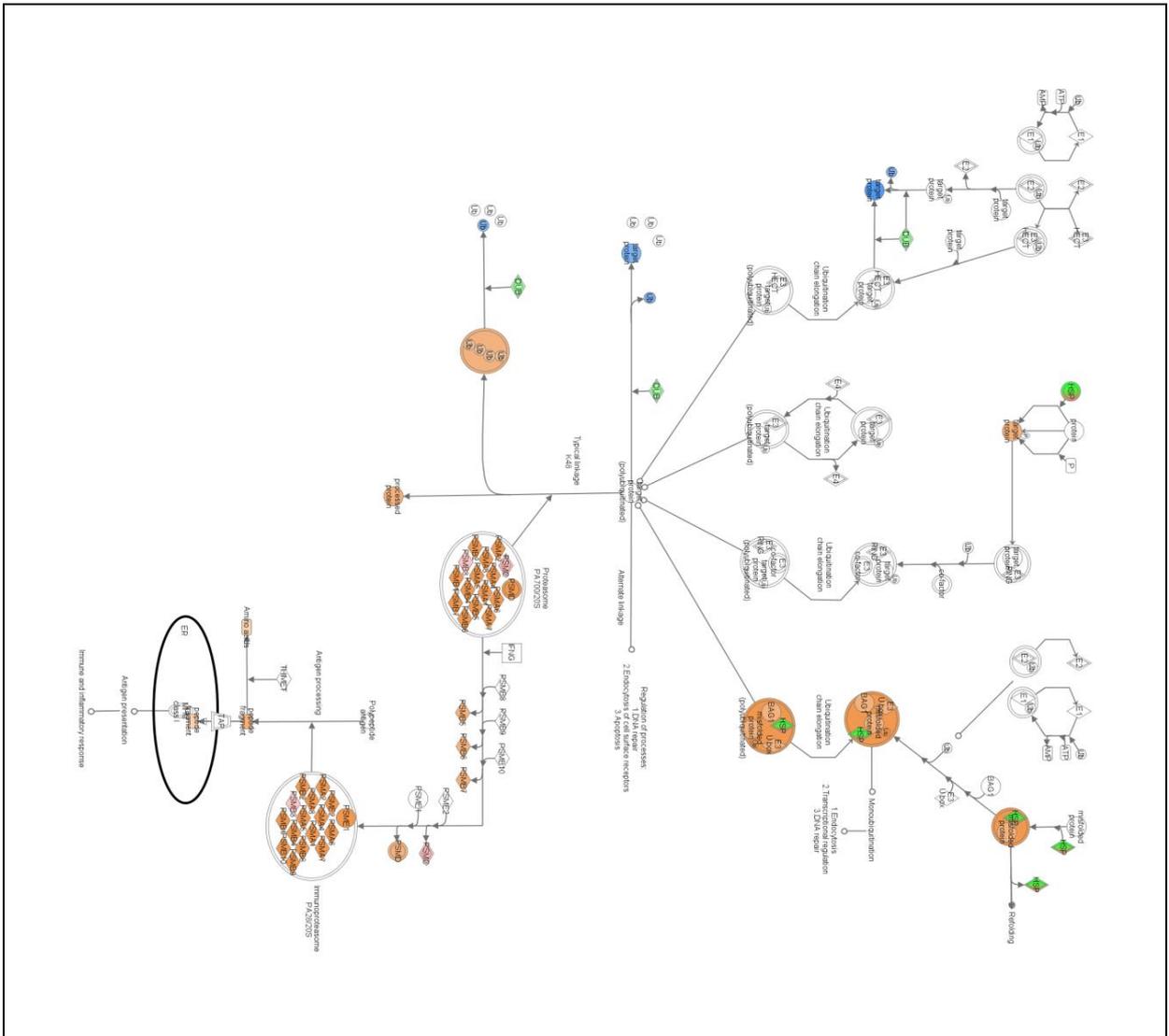


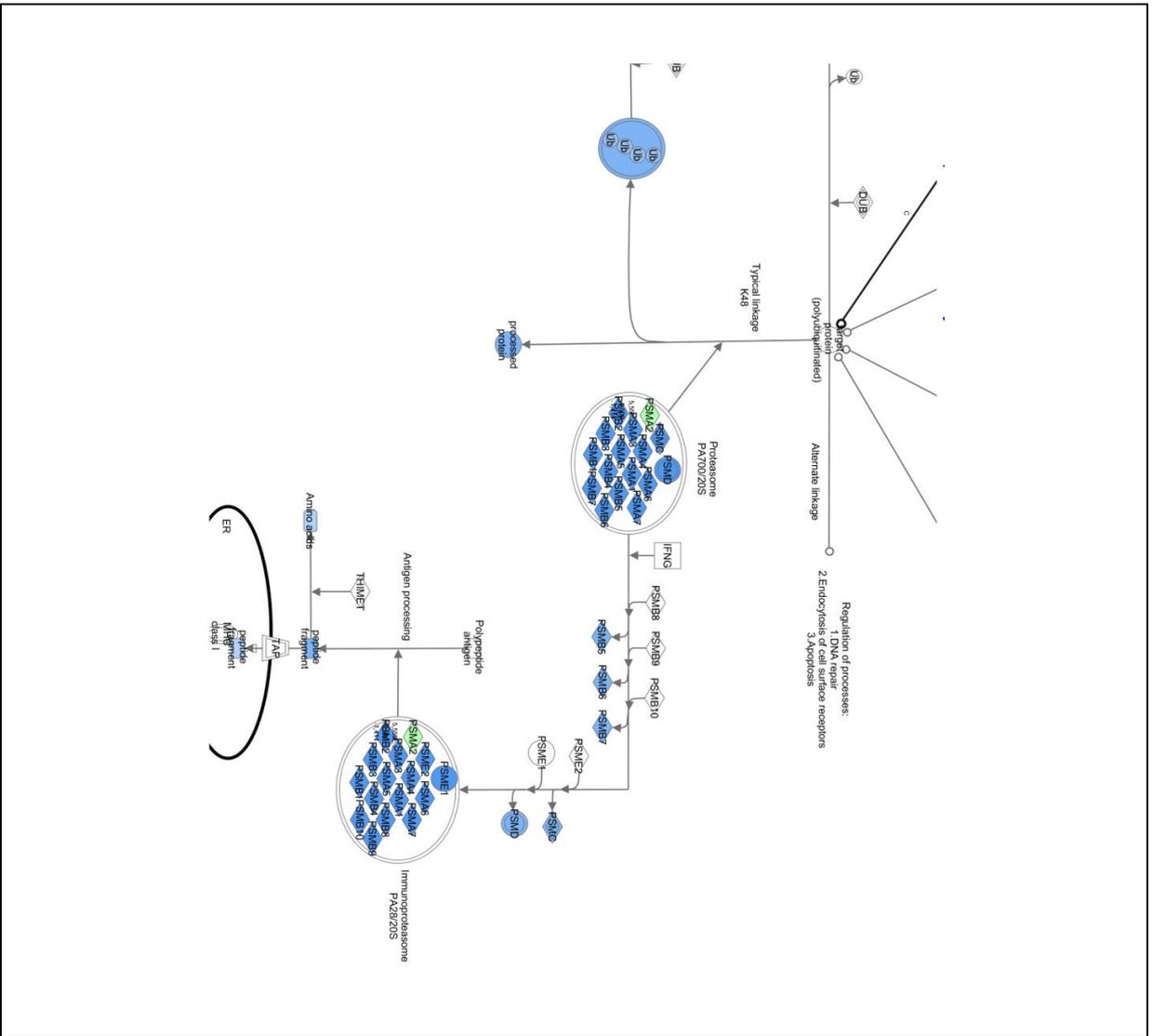
Abbildung 61: Ausschnitt aus dem Ubiquitination-Signalweg für AP2.5. Die Inhibierung des Signalweges wird wegen der Inhibierung bestimmter Teilbereiche wie dem Refolding durch IPA vorausgesagt.



Symbol	Bedeutung
□	Zytokin
□	Wachstumsfaktor
□	Chemikalie/Arzneimittel
◇	Enzym
◇	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
□	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
□	Peptidase
◇	Phosphatase
◇	Transkriptionsregulator
◇	Transaktionsregulator
◇	Transmembraner Rezeptor
◇	Transporter
◇	microRNA
◇	Complex/Gruppe
○	Andere

stark	hoch reguliert	schwach
herunter reguliert	eher unsicher	
eher sicher	vorhergesagte Aktivierung	
vorhergesagte Inhibierung		
führt zur Aktivierung		
führt zur Inhibierung		
inkonsistente Datenlage		
keine Vorhersage möglich		

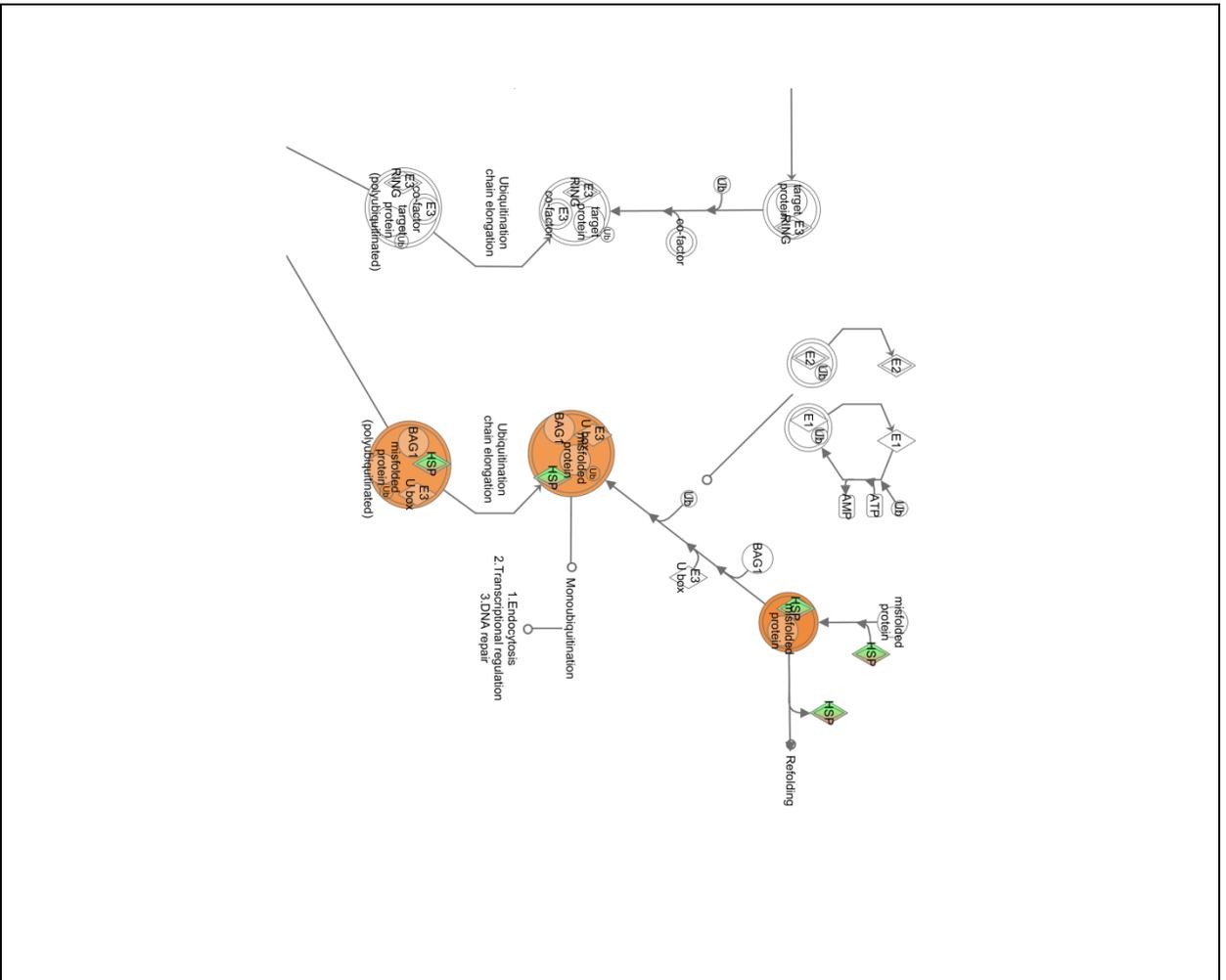
Abbildung 62: Ausschnitt aus dem Ubiquitination-Signalweg für AP25. Die Aktivierung des Signalweges wird wegen der Aktivierung des Proteasoms PA28 und anderer Teilbereiche durch IPA vorausgesagt.



Symbol	Bedeutung
□	Zytokin
□	Wachstumsfaktor
□	Chemikalie/Arzneimittel
◇	Enzym
□	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
▽	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
◇	Peptidase
△	Phosphatase
○	Transkriptionsregulator
○	Transaktionsregulator
○	Transmembraner Rezeptor
▽	Transporter
▽	microRNA
○	Complex/Gruppe
○	Andere

stark	hoch reguliert	schwach
herunter reguliert	eher unsicher	
eher sicher	vorhergesagte Aktivierung	
vorhergesagte Inhibierung		
	führt zur Aktivierung	
	führt zur Inhibierung	
	inkonsistente Datenlage	
	keine Vorhersage möglich	

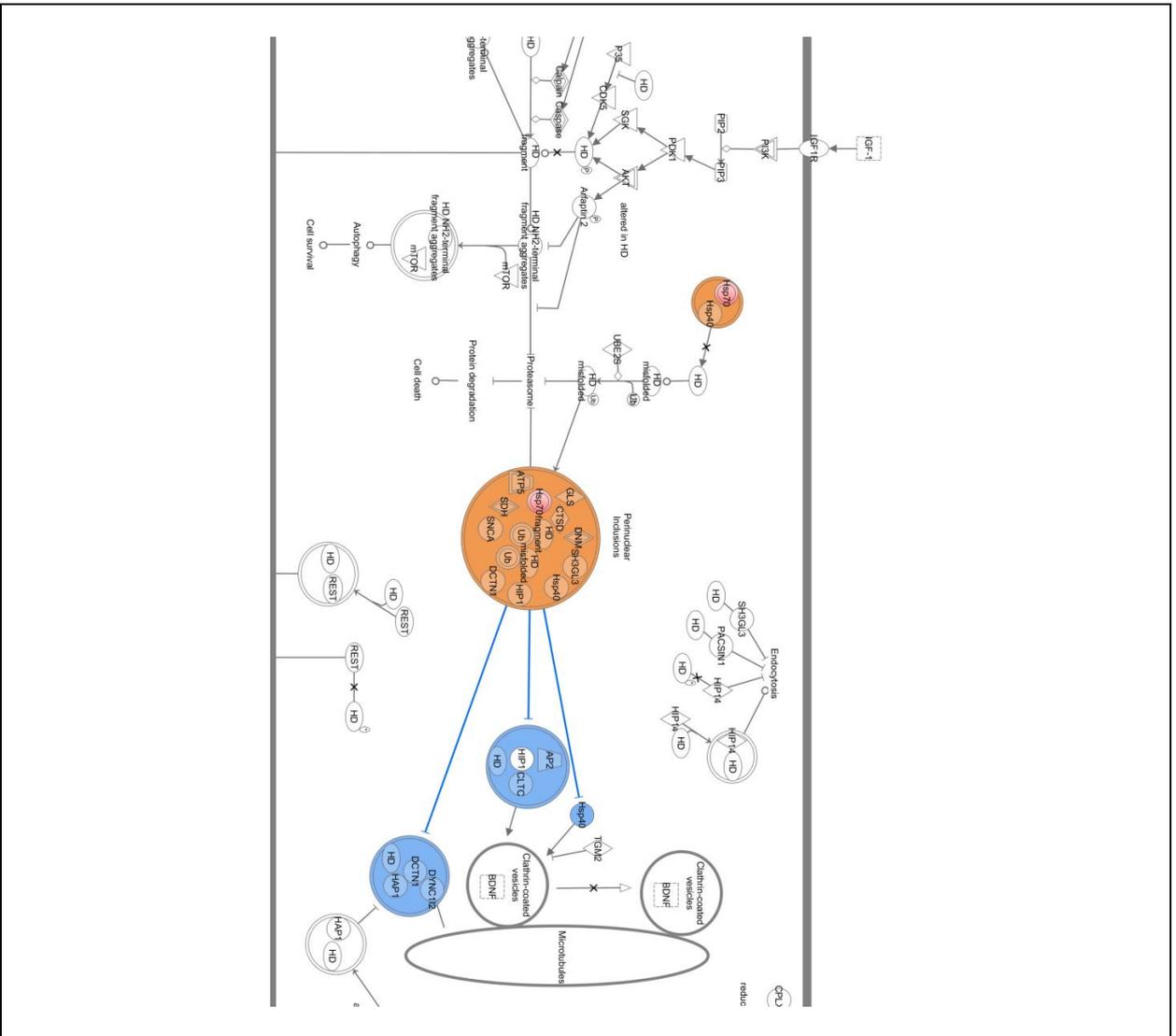
Abbildung 63: Ausschnitt aus dem Ubiquitination-Signalweg für SN0.5. Die Inhibierung des Signalweges wird wegen der Inhibierung des Proteasoms PA28 und anderer Teilbereiche durch IPA vorausgesagt.



Symbol	Bedeutung
□	Zytokin
□	Wachstumsfaktor
□	Chemikalie/Arzneimittel
◇	Enzym
□	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
▽	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
◇	Peptidase
◇	Phosphatase
◇	Transkriptionsregulator
◇	Transkriptionsregulator
◇	Transmembraner Rezeptor
◇	Transporter
◇	microRNA
◇	Complex/Gruppe
○	Andere

stark	hoch reguliert	schwach
herunter reguliert	eher unsicher	
eher sicher	vorhergesagte Aktivierung	vorhergesagte Inhibierung
führt zur Aktivierung	führt zur Inhibierung	inkonsistente Datenlage
keine Vorhersage möglich		

Abbildung 64: Ausschnitt aus dem Ubiquitination-Signalweg für SN5. Die Aktivierung wird wegen der Aktivierung des Prozesses Polyubiquitination durch IPA vorausgesagt.



Symbol	Bedeutung
□	Zytkin
□	Wachstumsfaktor
□	Chemikalie/Azneimittel
◇	Enzym
□	G-Protein gekoppelter Rezeptor
□	Ionen-Kanal
▽	Kinase
□	Liganden abhängiger nuklearer Rezeptor
◇	Peptidase
△	Phosphatase
○	Transkriptionsregulator
○	Transaktionsregulator
○	Transmembraner Rezeptor
○	Transporter
○	microRNA
○	Complex/Gruppe
○	Anderer

stark	hoch reguliert	schwach
herunter reguliert	eher unsicher	
eher sicher	vorhergesagte Aktivierung	eher unsicher
vorhergesagte Inhibierung	führt zur Aktivierung	
führt zur Inhibierung	inkonsistente Datenlage	
keine Vorhersage möglich		

Abbildung 65: Ausschnitt aus dem *Huntingtons Disease*-Signalweg für SN5. Die Aktivierung des Signalweges wird durch IPA wegen der Aktivierung der perinukleärer Inklusionen vorausgesagt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen, Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich erkläre, dass ich mich nicht bereits anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen entsprechenden Doktorgrad besitze und diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Der Inhalt der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Fakultät III Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin vom 15. April 2008 ist mir bekannt.

Berlin, 12.02.2014

Ulf Hansen

Curriculum Vitae

Name: Ulf Hansen

Geburtsdatum: 17.03.1980

Geburtsort: Niebüll

Bildungsweg

04/2010 - 03/2014

Doktorand am Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie

Technische Universität Berlin, Fachbereich Lebensmittelchemie (Prof. Dr. Lothar W. Kroh)

Thema: „*Silbernanopartikel und Silberionen: Physikalisch-chemische Charakterisierung und molekulare proteomische Effekte auf humane Enterozyten*“, angefertigt während der Anstellung an der BAM Bundesinstitut für Materialforschung- und prüfung, Fachbereich 6.5 Polymere in Life Science und Nanotechnologie (Prof. Dr. Andreas F. Thünemann), und am Bundesinstitut für Risikobewertung BfR, Abteilung 5 Lebensmittelsicherheit (Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen)

04/2001 – 11/2009

Diplom in Chemie

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Thema: „*Isoflavonanalytik in Nahrungsergänzungsmitteln aus Soja- bzw. Rotklee-Extrakten*“ angefertigt am Bundesinstitut für Risikobewertung BfR, Abteilung 5 Lebensmittelsicherheit (Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen)

06/1999

Abitur

Friedrich-Paulsen-Gymnasium in Niebüll