

AFM-Abbildung
Zelle des Lungengewebes

**Nano-Bio-Technologie:
Nanopartikel, Zelluläre Strukturen
und Bindungsreaktionen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Daniel M. Wesner

Fakultät für Physik
Universität Bielefeld

Dezember 2011

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.
Diese Arbeit ist auf alterungsbeständigem Papier gemäß ISO 9706 gedruckt.
Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.

Bielefeld, den 20.12.2011

(Daniel M. Wesner)

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von

Prof. Dr. Dario Anselmetti

in der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften
in der Fakultät für Physik an der Universität Bielefeld

Einleitung	1
1 Biologischer Hintergrund und physikochemische Eigenschaften der Proben.....	3
1.1 Immunantwort und Symbiose: <i>M. sativa</i> und <i>S. meliloti</i>	3
1.1.1 Signaltransduktion durch kleine G-Proteine	4
1.1.2 Struktur und Funktion von Ms-Rac1	6
1.1.3 Struktur bakterieller Zellen und deren Oberflächen.....	7
1.2 Interaktion von Nanopartikeln mit tierischen Zellen	10
1.2.1 Aufbau und Funktion tierischer Zellen	10
1.2.2 Mechanismen der Stoffaufnahme in tierischen Zellen.....	11
1.2.3 Herstellung von Nanopartikeln	13
1.2.4 Interaktion von Nanopartikeln mit biologischen Systemen	14
2 Physikalische Messtechniken.....	17
2.1 FCS	17
2.1.1 Fluoreszenz.....	18
2.1.2 Konfokale Mikroskopie.....	19
2.1.3 Autokorrelation	20
2.1.4 Signal-Rausch-Verhältnis.....	24
2.1.5 Diffusion.....	26
2.2 AFM	28
2.2.1 Intermolekulare Kräfte	29
2.2.2 Kraftmessung und Kraftspektroskopie.....	30
2.2.3 Kalibration der Kraftmessung	32
2.2.4 Abbildung und Abbildungsmodi	33
3 Material und Methoden	35
3.1 Bindung von GTP an Ms-Rac1	35
3.1.1 FCS-Aufbau	35
3.1.2 Messungen der GTP-Bindung an Ms-Rac1	36
3.1.3 Chromatographische Analyse und Reinigung von GTP-Atto.....	37
3.2 Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Zellen	38
3.2.1 Kultivierung der Zellen	38
3.2.2 Präparation der Proben	39
3.2.3 AFM-Untersuchungen.....	44
3.2.4 SEM-Untersuchungen	49
3.3 Oberflächenstruktur von Bakterienzellen	49
3.3.1 Kultivierung der Bakterien.....	49
3.3.2 Präparation der Proben	49
3.3.3 AFM-Untersuchungen.....	50
3.3.4 SEM-Untersuchungen	51

4	Ergebnisse und Diskussion	52
4.1	Bindung von GTP an Ms-Rac1	52
4.1.1	Photophysik des GTP-Atto.....	53
4.1.2	Aggregation von Ms-Rac1	56
4.1.3	Bindungskinetik in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration.....	59
4.1.4	Thermodynamik und Kinetik	62
4.1.5	Zusammenfassung	64
4.2	Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen	66
4.2.1	Eigenschaften der Nanopartikel	66
4.2.2	Eigenschaften der Zellen	73
4.2.3	Nanopartikel auf Zelloberflächen.....	77
4.2.4	Kraftspektroskopie zwischen NP und Zellen	99
4.2.5	Zusammenfassung	110
4.3	Oberflächenstruktur von Bakterienzellen	113
4.3.1	SEM-Untersuchungen	113
4.3.2	AFM-Untersuchungen.....	115
4.3.3	Diskussion	122
4.3.4	Zusammenfassung	126
5	Zusammenfassung und Ausblick	127
	Glossar	130
	Literaturverzeichnis	132
	Veröffentlichungen	145
	Konferenzbeiträge	145
	Danksagungen.....	146

Einleitung

Die Begriffe Nanowissenschaften und Nanotechnologie bezeichnen einen aktuellen Forschungsbereich, der zu industriell und gesellschaftlich relevanten Technologien und Produkten geführt hat und weiterhin führen wird. Die Bezeichnung als Zukunftstechnologie basiert darauf, dass Materialien mit Dimensionen auf der Nanometer-Ebene die Eigenschaften bestehender Produkte optimieren oder gänzlich neue Effekte hervorrufen können. Diese haben nicht nur Bedeutung für die Materialwissenschaften sondern können auch gezielt (Pharmazie) oder zufällig (Toxikologie) Relevanz für biologische Prozesse haben. Viele Lebensvorgänge in Zellen spielen sich ebenfalls im Nanometerbereich ab, so dass Biomoleküle wie auch Nanopartikel als natürliche beziehungsweise künstliche Werkzeuge verstanden und untersucht werden können. Diese Arbeit widmet sich sowohl der Quantifizierung rein biochemischer Prozesse als auch der Untersuchung von Wechselwirkungen lebender Systeme mit anorganischen Nanopartikeln und stellt damit eine Kombination von Biophysik und Nanowissenschaft dar.

In der vorliegenden Studie werden die Reaktionen von biologischen Zellen auf äußere Stimuli untersucht. Dabei kann man die Zellen taxonomisch den Reichen der (Eu-)Bakterien, der Pflanzen sowie der Tiere zuordnen, so dass sowohl Prokaryoten wie auch Eukaryoten vertreten sind. Die Darstellung der Ergebnisse ist in drei thematische Abschnitte unterteilt: Im ersten Teil werden die Eigenschaften eines Proteins charakterisiert und die Bindung eines Nucleotid-Liganden biophysikalisch analysiert. Der zweite Teil behandelt anorganische Nanopartikel und deren Interaktion mit menschlichen und tierischen Zellen. Im dritten Teil werden Veränderungen von bakteriellen Zelloberflächen unter verschiedenen Umwelt- und Präparationsbedingungen untersucht.

Die Bedeutung der Untersuchungen an dem pflanzlichen System (*Medicago sativa*) liegt im Verständnis und der damit möglichen Optimierung von natürlichen Abwehrreaktionen gegenüber pathogenen Bakterien. Für das hierbei beteiligte Protein *Ms-Rac1* wurden von Partnern funktionale Aspekte aufgeklärt, so dass nun in dieser Arbeit Methoden zur quantitativen Analyse der Reaktionen zu entwickeln waren. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) sowie der Rasterkraftmikroskopie (AFM). Dabei ist es gelungen, thermodynamische und kinetische Kenngrößen zu bestimmen und Eigenschaften des Proteins zu charakterisieren, die durch die zuvor eingesetzten Verfahren nicht zugänglich waren. Neben der Immunabwehr von Pathogenen erfordert auch die spezifische Erkennung und Interaktion mit symbiotischen Bakterien (z.B. *Sinorhizobium meliloti*), die durch die Fixierung atmosphärischen Stickstoffs einen wichtigen Beitrag zu einer natürlichen Bodendüngung leisten, ähnliche Signalwege.¹ Diese Bakterien kommen im Erdboden vor, so dass sie schwankender Feuchtigkeit und gegebenenfalls auch Trocknung ausgesetzt sind. Solche und noch extremere Bedingungen sind auch als Teil der Präparationstechniken für elektronenmikroskopische Analysen notwendig, so dass es zu Veränderungen der Ultrastruktur und mitunter der gesamten Form der Zelle kommen kann. Diese Einflüsse sind mit den jeweiligen präparativen Schritten zu korrelieren und möglichst gering zu halten, um eine realistische Darstellung zu gewährleisten. Hierzu wurden verschiedene elektronenmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Techniken eingesetzt und die Entwicklung von typischen Merkmalen präparierter Bakterien analysiert.

Diese mikroskopischen Methoden sind ebenfalls für die Charakterisierung von unterschiedlichen Nanopartikeln (NP) und deren Interaktion mit tierischen Zellen eingesetzt worden. NP bieten Möglichkeiten einer gezielten Anwendung im biologischen und medizinischen Bereich beispielsweise als Drug-Carrier, können allerdings auch toxische

Effekte hervorrufen, welche in Kooperation mit weiteren Partnern eingehend charakterisiert wurden. In beiden Fällen wird die Interaktion mit dem Organismus (hier: Mensch und Ratte) durch die Bindung an der Zelloberfläche (hier: Lungengewebe) eingeleitet. Dieser Vorgang ist durch Abbildungen sowie kraftspektroskopische Verfahren untersucht worden, wobei unter anderem Ergebnisse hinsichtlich der Größe, der Anordnung und lokalen Verteilung von gebundenen NP wie auch der dabei wirkenden Kräfte erarbeitet wurden. Das Ziel des Gesamtprojektes „NanoCare“ ist es, das Gefährdungspotential verschiedener industriell genutzter NP einzuschätzen und wenn möglich Wege aufzuzeigen, es durch gezielte Modifikationen zu minimieren.

1 Biologischer Hintergrund und physikochemische Eigenschaften der Proben

1.1 Immunantwort und Symbiose: *M. sativa* und *S. meliloti*

Höhere Organismen wie Tiere und der Mensch sind von einer Vielzahl an Mikroorganismen umgeben, teilweise dienen sie sogar als natürlicher Lebensraum für größere Mengen an Bakterien (z.B. im Darm, auf der Haut). Das Immunsystem hat die Aufgabe, insbesondere schädliche Mikroben zu erkennen und zu eliminieren. Auch Pflanzen verfügen über Abwehrmechanismen, die einigen grundlegenden Vorgängen im Tierreich ähneln, ohne jedoch auf die komplexen und hoch spezialisierten Zellen des adaptiven Immunsystems zurückgreifen zu können. Als Verteidigungsmittel dienen beispielsweise starke Oxidationsmittel auf Basis von biogenen sauerstoffhaltigen Radikalen – Reactive Oxygen Species (ROS)^a – die organisches Material zerstören und Pathogene so abtöten.² Durch die unspezifische Wirkungsweise der ROS werden allerdings nicht nur die schädlichen Mikroorganismen sondern auch die umgebenden Zellen der Pflanze in Mitleidenschaft gezogen (Abb. 1a).

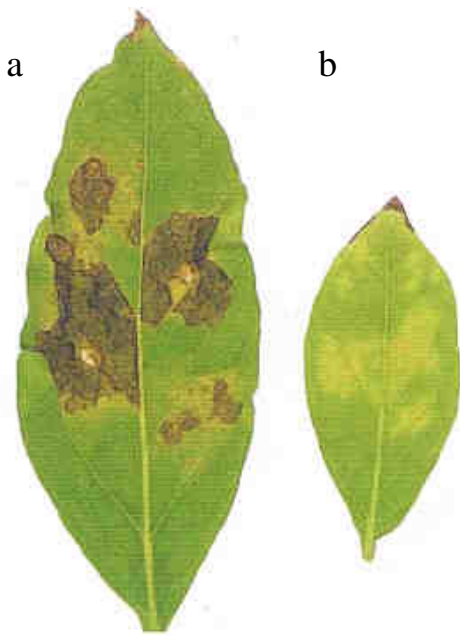


Abb. 1 Normale Abwehrreaktion der Pflanze (*Nicotiana tabacum*) nach Kontakt mit Molekülen (Elicitor) pathogene Hefen durch Bildung von ROS (links), verminderte Reaktion aufgrund einer Inhibition des Signalweges durch antisense cDNA von Ms-Rac1 (rechts). (aus Schiene et al. 2000)³

Eine solche Reaktion beschränkt sich auf die Region der Infektion und erfordert die Erkennung der Bakterien als Pathogen. Dieses geschieht durch die Bindung typischer bakterieller Moleküle an Rezeptoren der Pflanzenzellen. Diese triggern eine Reaktionskaskade, die das eingehende „Signal“ verstärkt, gegebenenfalls mit einem

^a Diese Substanzen spielen auch im Zusammenhang mit toxischen Effekten von NP eine Rolle, da sie teilweise als Reaktion von den Zellen vermehrt gebildet werden oder auch durch chemische Reaktionen an der Partikeloberfläche entstehen können. In diesem Fall führt ihre Präsenz zur Schädigung der Körperzellen.

Schwellenwert vergleicht und im Zellkern und im Cytosol verarbeitet. Die Signalwege können sich aufspalten, um verschiedene Reaktionen einzuleiten oder auch konvergieren, wodurch unterschiedliche Auslöser zu ähnlichen Resultaten führen. Die in diesem Zusammenhang relevanten Signaltransduktionsprozesse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt. Besondere Betonung liegt dabei auf dem Protein Ms-Rac1, das als binärer Schalter die Informationsweitergabe kontrolliert und in dieser Studie untersucht wurde. Seine Bedeutung wird durch seine selektive Inaktivierung deutlich, die zu einem weitgehenden Ausbleiben der pflanzlichen Abwehrreaktion führt (Abb. 1 b).³

Neben phytopathogenen existieren auch symbiotische Bakterien, die von der Pflanze als solche erkannt werden. Daraus resultieren völlig andere Reaktionen der Wirtspflanze, die die Symbionten beispielsweise in spezielle Bereiche ihrer Wurzeln integrieren. Eine solche symbiotische Beziehung besteht zwischen *M. sativa* (Luzerne) und *S. meliloti* und ist typisch für Leguminosen (Hülsenfrüchtler) und Rhizobien (Knöllchenbakterien). Die Bakterien entwickeln sich zu Bacteroiden, was mit einer Umstellung des Stoffwechsels einhergeht. Sie erhalten von den Pflanzen energiereiche Kohlenstoffverbindungen und im Gegenzug reduzieren sie atmosphärischen molekularen Stickstoff, den sie damit in eine für die Pflanze nutzbare Form überführen.⁴ Da Stickstoff essentieller Bestandteil unter anderem von Aminosäuren und Nukleinsäuren ist, wird so die Besiedlung von nährstoffarmen Böden ermöglicht. Zu den Leguminosen gehören eine Reihe von Nutzpflanzen (Erbsen, Bohnen, Linsen und einige Futterpflanzen wie die Luzerne). Zudem haben sie durch die Verwendung als Gründünger große Bedeutung für die ökologische Landwirtschaft. Für die Interaktion der Bakterien mit Pflanzenzellen spielen Moleküle der Zellmembran eine wichtige Rolle. Diese lassen sich biochemisch charakterisieren und hochauflösende mikroskopische Techniken bieten die Möglichkeit, Membranstrukturen und eingelagerte Proteine darzustellen und hinsichtlich ihrer Anordnung zu untersuchen. Durch geeignete Markierungstechniken können Proteine anhand von elektronenmikroskopischen Abbildungen spezifisch identifiziert werden. Für diese Untersuchungen sind spezielle Präparationsschritte notwendig, die die Gestalt der Zelloberflächen verändern und beispielsweise häufig zur Ausbildung von Falten der Membran führen. Im Gegensatz zu SEM erlaubt AFM die Abbildung von Bakterien auch unter nativen Bedingungen in Flüssigkeit. So wurde auf die für SEM notwendigen Präparationsschritte sukzessive verzichtet und die Veränderungen der Bakterienoberfläche verfolgt.

1.1.1 Signaltransduktion durch kleine G-Proteine

Die sogenannten kleinen GTP-bindenden Proteine (kurz: kleine G-Proteine) besitzen eine relativ geringe Molekülmasse von ca. 20 – 25 kDa und gehören zu der Gruppe von GTP-bindenden Proteinen. Diese umfasst darüber hinaus auch die heterotrimeren G-Proteine (aufgrund der Molekülmasse auch als „große G-Proteine“ bezeichnet). Beide Gruppen sind an der Signaltransduktion beteiligt, wobei die großen G-Proteine direkt an der Zellmembran mit speziellen Rezeptoren interagieren (daher der Name: G-protein-coupled receptor, GPCR) und dort aktiviert werden. Kleine G-Proteine werden zumeist ebenfalls an der Membran aktiviert. In tierischen Zellen werden kleine G-Proteine in der Ras-Superfamilie zusammengefasst, die über 150 Proteine enthält, welche in fünf Untergruppen eingeordnet sind.⁵ Sie erfüllen Kontrollfunktionen in unterschiedlichen Bereichen wie beispielsweise dem Zellwachstum (Ras), dem intrazellulären Transport von Vesikeln (Rab) oder der Organisation des Cytoskeletts^b und der Abwehr von Pathogenen (Rho/Rac).⁶ Aufgrund der großen Bedeutung

^b Der Aufbau und die Dynamik des Cytoskeletts werden für die AFM-Abbildung tierischer Zellen eine Rolle spielen (Kap.4.2.2), der Vesikeltransport hat für die Aufnahme und die Lokalisierung von NP in der Zelle Bedeutung (Kap.4.2.3).

nicht zuletzt auch für die Entstehung von Krebserkrankungen durch Mutationen (Ras: Rat sarcoma, Sarkom: Tumor des Stützgewebes)⁵ ist die wissenschaftliche Datenlage im Bereich tierischer (insbesondere humaner) Proteine umfangreicher als für vergleichbare pflanzliche Systeme.⁷ Es existieren Homologien zwischen Proteinen der Rho/Rac Familie und pflanzlichen Proteinen, so dass man diese als ROP (Rho of plants) bezeichnet hat.⁸ Daher können einige bekannte Konzepte der Regulation auf pflanzliche Systeme übertragen werden, was die wissenschaftliche Arbeit in diesem Bereich erleichtert. Hierbei bleibt allerdings im Einzelfall zu prüfen, ob ähnliche Phänotypen und strukturelle Homologien von Proteinen sich auch auf die biochemische und funktionale Ebene auswirken.

Generell kann man kleine G-Proteine als binäre Schalter auffassen, deren Aktivität durch die Art eines gebundenen Guanin-Nucleotids determiniert wird. Ihre Funktion ist in einen Zyklus eingebunden, der durch weitere Proteine reguliert wird (Abb. 2). G-Proteine liegen in der Regel über einen Lipidanker an der Plasmamembran gebunden in der inaktiven Form vor (GDP gebunden). Dort werden sie – beispielsweise infolge der Stimulation des Rezeptors RLK (receptor-like kinase) – durch Interaktion mit einem GEF (guanine nucleotide exchange factor) aktiviert, indem das GDP gegen GTP ausgetauscht wird. In diesem Zustand interagieren sie mit weiteren Proteinen (Effektoren), so dass das aktivierende Signal weitergeleitet wird. Werden so mehrere Effektoren aktiviert, kommt es zu einer Verstärkung des Signals. G-Proteine besitzen eine GTPase-Funktion, die zu einer Hydrolyse des GTP und damit zu einer Inaktivierung führt. Die intrinsische GTPase-Aktivität ist allerdings schwach ausgeprägt, so dass ein G-Protein relativ lange im GTP-gebundenen aktiven Zustand bleiben kann. Hier existiert eine weitere Regulationsmöglichkeit, indem die Hydrolyse durch GAP (GTPase activating protein) beschleunigt wird. Befindet sich das kleine G-Protein wieder im inaktiven GDP-gebundenen Zustand, kann dieser durch Assoziation mit GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) stabilisiert werden, was eine erneute Aktivierung erschwert. Zudem bindet das GDI den C-terminalen Lipid-Anker des G-Proteins und verhindern damit die Assoziation mit der Cytoplasmamembran. Dadurch verbleibt der Komplex im Cytosol und eine Aktivierung durch die Interaktion mit membranständigen GEF wird unterbunden.

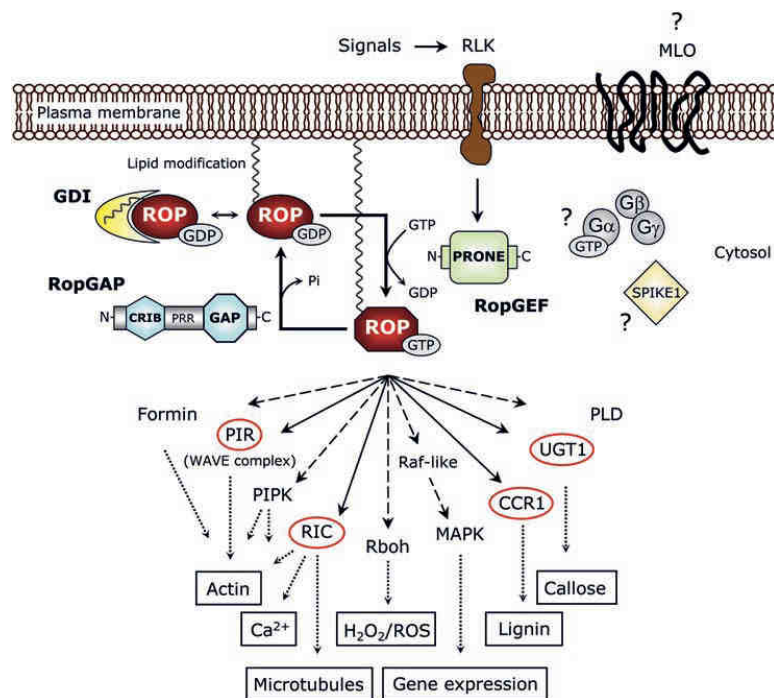


Abb. 2 Signaltransduktion durch kleine G-Proteine (ROP) in Pflanzen. Durchgezogene Pfeile symbolisieren direkte Wechselwirkungen, gestrichelte Pfeile vermutete oder indirekte Interaktionen mit Effektoren. (aus Berken, A. 2006)⁸

Diese allgemeine Beschreibung gilt für tierische⁹ wie auch für pflanzliche kleine G-Proteine vom ROP-Typ.⁸ Dabei stellen die genannten Interaktionspartner jeweils Gruppen von Proteinen dar, die durch ihre Funktion und ihren Aufbau – ähnlich den Familien der kleinen G-Proteine – eine Verwandtschaft dokumentieren. Demzufolge kann man annehmen, dass es zu einem neu entdeckten G-Protein einen entsprechenden Satz an Regulatoren gibt und umgekehrt. Auch hinsichtlich der unterschiedlichen Bereiche, in denen sich die Aktivität eines G-Proteins letztlich äußert (Abb. 2 unten), sind oftmals noch nicht alle Effektoren und Reaktionsschritte bekannt (Abb. 2, gestrichelte Verbindungen). Eine Arbeitsweise der Biologie, die hier zum Einsatz kommt, ist die Inaktivierung oder Mutation eines Proteins und die Beschreibung des resultierenden Phänotyps. So werden aus Veränderungen der Physiologie oder des Verhaltens des Organismus Informationen über das jeweilige Protein gewonnen, ohne dass im Vorfeld alle beteiligten Interaktionspartner bekannt sein müssen.

1.1.2 Struktur und Funktion von Ms-Rac1

Das in dieser Arbeit charakterisierte ROP-Protein Ms-Rac1 wurde 2000 in der Gruppe von Prof. K. Niehaus aus *Medicago sativa* (Luzerne) isoliert. Seine Beteiligung an einer pflanzlichen Abwehrreaktion konnte festgestellt werden, da Tabakpflanzen, die gentechnisch so verändert wurden, dass sie den Gegenstrang der kodierenden DNA synthetisieren (cDNA: complementary DNA),^c eine stark verminderte Bildung von ROS zeigen, die eine Verteidigungsreaktion der Pflanze darstellt (Abb. 1).³ Im Folgenden soll der biologische Hintergrund der Auslösung und die Wirkungsweise dieser Abwehrreaktion erläutert werden und anschließend der molekulare Aufbau von Ms-Rac1 dargelegt werden. Die Aminosäuresequenz des Proteins ist ein wichtiges Indiz für die Homologie zu den humanen Proteinen Hs-Rac1 und Hs-Rac2. Weiterhin ergeben sich daraus wichtige Informationen für die Konzeption und Interpretation der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen.

Biologische Zellen synthetisieren eine Vielzahl an verschiedenen Molekülen, wobei manche Merkmale für ganze Gruppen von Organismen typisch sind. Hierzu zählen beispielsweise Bestandteile der Zellwand von Pilzen, Proteine der Flagellen von Bakterien oder Lipopolysaccharide (LPS), die die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien aufbauen (folgendes Kapitel).¹⁰ Einige dieser Strukturen werden vom angeborenen Immunsystem der Tiere erkannt (pathogen-associated molecular pattern, PAMPs), wobei beispielsweise LPS die Anwesenheit von (oftmals pathogenen) gram-negativen Bakterien anzeigt und heftige Entzündungsreaktionen auslösen kann (Endotoxin).¹¹ Auch Pflanzen haben Rezeptoren, die solche häufigen Merkmale (Elicitoren) von potentiell schädlichen Organismen erkennen und Abwehrreaktionen induzieren.¹⁰ Als gut untersuchte Beispiele können hier die Elicitor/Rezeptor-Paare Flagellin/FLS2 sowie EF-Tu/EFR genannt werden, wobei die Elicitoren als Proteine bakterieller Flagellen bzw. des bakteriellen Transkriptionsapparates sowohl typisch für Bakterien sind als auch in großer Anzahl gebildet werden.¹² Im eingangs genannten Fall ist Ms-Rac1 an einem solchen Signaltransduktionsprozess beteiligt,³ wobei hinsichtlich der Identität der aktivierenden Regulatoren noch weiterer Forschungsbedarf besteht.

Auch in Bezug auf die zellulären Reaktionen, die durch Ms-Rac1 ausgelöst werden, existieren bekannte Analogien in tierischen Systemen. Die als oxidative burst bezeichnete Synthese und

^c Durch diese Antisense-Technik wird die komplementäre mRNA gebunden und so die Synthese des entsprechenden Proteins blockiert. Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung der DNA-Sequenz zwischen Ms-Rac1 und homologen Proteinen der Tabakpflanze wurde deren Funktion unterbunden, was für eine vergleichbare Rolle von Ms-Rac1 in *M. sativa* spricht.

Freisetzung von ROS kommt beispielsweise in Neutrophilen und anderen Leukozyten vor, die Fremdkörper aus dem Körper aufnehmen und intrazellulär abbauen. Von zentraler Bedeutung ist dabei der Proteinkomplex NADPH-Oxidase (in tierischen Zellen auch als respiratory burst oxidase, RBO bezeichnet), der den Transfer eines Elektrons von NADPH auf molekularen Sauerstoff katalysiert, wobei O_2^- entsteht. Dieses Radikalanion ist hoch reaktiv und bildet weitere Produkte, die als ROS bezeichnet werden und organisches Material des Fremdkörpers oxidativ zerstören.¹³ In Pflanzen existiert ein vergleichbarer Enzymkomplex, der als Rboh (respiratory burst oxidase homologue) bekannt ist. Er weist einige strukturelle Ähnlichkeiten zu RBO auf, wobei es bei einzelnen Proteinkomponenten zu Unterschieden zwischen der tierischen und pflanzlichen NADPH-Oxidase kommt.¹⁴ In beiden Fällen spielen G-Proteine der Rac-Familie eine regulatorische Rolle,^{15,16} wobei hier das humane Hs-Rac2 hervorzuheben ist, zu dem Ms-Rac1 strukturell verwandt ist.¹⁷

1.1.3 Struktur bakterieller Zellen und deren Oberflächen

Bakterien stellen einfach aufgebaute Organismen dar, die als einzellige Lebewesen auch über Artgrenzen hinweg einen vergleichsweise homogenen Aufbau besitzen. Ihre Stoffwechsellleistungen sind sehr divers, so dass einige Arten auch oder gerade unter extremen Umgebungsbedingungen wie Temperatur, Druck oder chemischer Zusammensetzung lebensfähig sind. Sie weisen eine Größe von einigen hundert nm bis zu wenigen μm Länge auf (Abb. 3 A – C). Im Unterschied zu Eukaryoten verfügen sie über keinen Zellkern, so dass ihre DNA frei im Cytosol vorliegt, weswegen sie als Prokaryoten bezeichnet werden.¹⁸ Ihr Cytosol wird durch eine Lipiddoppelschicht – die Plasmamembran (PM) – begrenzt. Im Unterschied zu tierischen Zellen schließt sich als weitere Schicht die Zellwand an (Abb. 3 D). Diese besteht aus einem Peptidoglycan-Netz (PG, auch als Murein bezeichnet), das aus regelmäßig angeordneten Kohlenhydrat- und Oligopeptid-Einheiten aufgebaut ist. Die Dicke dieser Lage wird mit 2 – 10 nm für ein einschichtiges Netz und mit ca. 20 – 80 nm für mehrschichtige Netze angegeben.¹⁹⁻²¹ Die wichtige Klassifizierung in gram-negative (einschichtiges Murein) und gram-positive (mehrschichtiges Murein) Bakterien hat sich historisch aus der hieraus resultierenden unterschiedlichen Farbstoffbindung der Zellen entwickelt.²² Bei gram-negativen Bakterien folgt darauf noch eine zweite Lipidmembran (outer membrane, OM). Die Membran(en) und das Peptidoglycan werden zusammengefasst als Zellhülle bezeichnet.

Die Zellwand bestimmt die Gestalt der Bakterienzellen. Im Gegensatz zu einer leicht deformierbaren Lipidmembran hält der Murein-Sacculus dem hohen Innendruck (Turgor) der Bakterien stand^{23,24} und wird dadurch in die typische Form gebracht. Anhand von lichtmikroskopischen Untersuchungen hat man schon früh sphärische, stäbchenförmige und wendelförmige Bakterien unterschieden und die Morphologie zur Klassifizierung herangezogen (Abb. 3 A – C). Durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie konnte die Struktur der Zellwand selbst dargestellt und bis hin zu eingelagerten Proteinkomplexen analysiert werden.²⁵ Hierbei spielen die Präparation der Proben und die Untersuchungsmethoden eine nicht zu unterschätzende Rolle, was neben biologischen Schwankungen auch für die große Spanne der eingangs genannten Dicke des Mureins verantwortlich ist.¹⁹ Auch weitere Veränderungen der Probe – wie das Entstehen von Falten oder Wülsten auf der Oberfläche – werden oft mit dem Einfluss der Präparation begründet.²⁶ Im Folgenden soll der Aufbau der Zellwand gram-negativer Bakterien genauer dargestellt werden, um die in dieser Arbeit systematisch untersuchten Charakteristika und Veränderungen von Oberflächenstrukturen biologisch einzuordnen.

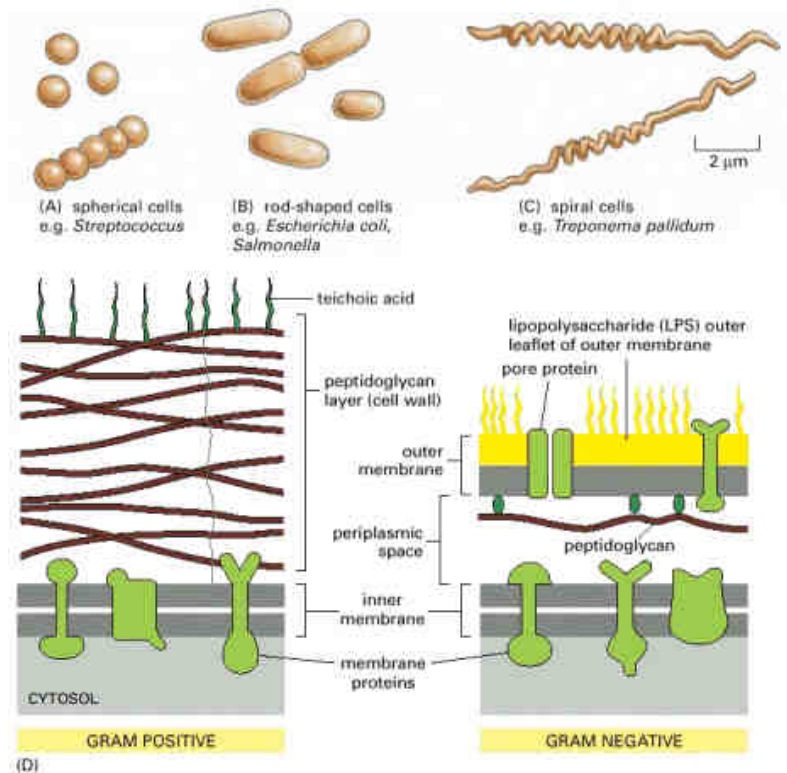


Abb. 3 Typische Formen und Anordnungen von Bakterienzellen (A – C). Schematischer Aufbau der Bakterienhülle (D) mit Charakteristika gram-negativer und gram-positiver Zellen. (aus Molecular Biology of the Cell)²¹

Die Plasmamembran trennt das Cytosol vom periplasmatischen Raum, der zwischen der inneren und äußeren Membran liegt und das Peptidoglycan beinhaltet. Sie gestattet durch eingelagerte Transportproteine und Kanäle den Stoffaustausch mit der Umgebung und im Unterschied zu eukaryotischen Zellen auch den Transport von Komponenten des Peptidoglycans zum Aufbau der Zellwand. Dies ist ein kontinuierlicher Prozess, der für das Wachstum und die Zellteilung notwendig ist. Das Periplasma stellt einen gelartigen Raum dar, der neben dem PG auch weitere Proteine enthält und einen Durchmesser von etwa 20 nm aufweist.²⁶ Das PG besteht aus linearen Polysaccharidketten, die aus den Disaccharidbausteinen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure aufgebaut werden. Diese sind durch Oligopeptide miteinander verknüpft, so dass ein Netzwerk entsteht. Die Verbindungen lassen Raum, um den Stoffaustausch mit der Umgebung zu gestatten. Dabei befindet sich das PG in einem steten enzymatisch katalysierten Auf- und Abbau, der es den Anforderungen des Zellwachstums anpasst.^d Dabei werden bis zu 50 % des PG während eines Zellzyklus (ca. 30 min) umgebaut.²⁷

Die äußere Membran ist selektiv permeabel und bildet so einen Schutzwall des Bakteriums gegenüber potentiell schädlichen Stoffen der Umgebung.²⁸ Das führt beispielsweise dazu, dass gram-negative Bakterien weniger empfindlich auf Penicillin und andere Antibiotika reagieren, die das Murein beeinflussen, als gram-positive Bakterien. Der Aufbau der OM unterscheidet sich deutlich von dem anderer biologischer Lipidmembranen. Während die innere Hälfte ebenfalls weitgehend aus Phospholipiden besteht, machen Lipopolysaccharide den überwiegenden Anteil der äußeren Hälfte aus. Eine Bakterienzelle verfügt über ca. 10^6 LPS und 10^7 Phospholipidmoleküle.²⁷ Ein LPS-Molekül gliedert sich von innen nach

^d Hierdurch das PG wird es zu einem Angriffspunkt für verschiedene Antibiotika wie Penicillin, die den Aufbau inhibieren. Durch den hohen Innendruck kommt es darauf zu einem Anschwellen und zur Lyse der Bakterien.

außen in die Bereiche Lipid A, innere und äußere Kernregion sowie das O-Antigen. Das Lipid A besteht aus mehreren Karbonsäuren, die das Molekül in der Membran verankern. Sie sind an einem Kohlenhydratgerüst (Kdo) gebunden, das zwischen verschiedenen Bakterienspezies weitgehend konserviert ist. Dieser Bereich des Moleküls ist entscheidend für die geschilderte Erkennung (PAMP) und die Abwehrreaktion durch Immunzellen. Er enthält zudem Phosphatgruppen, die über elektrostatisch gebundenes Magnesium Verbrückungen zu benachbarten LPS-Molekülen schaffen. Die folgenden Bereiche bestehen aus weitgehend linearen Polysacchariden. Sie werden aus repetitiven Oligosaccharideinheiten aufgebaut. Insbesondere das O-Antigen zeichnet sich dabei durch eine hohe Diversität der Zusammensetzung aus. Während die Länge der Kernregion ca. 25 Å misst, beträgt die des O-Antigen 13 – 400 Å.²⁸

Die drei Lagen der Bakterienhülle sind nicht völlig unabhängig voneinander, sondern punktuell miteinander verbunden. In der OM eingelagert finden sich beispielsweise Proteine, die kovalente Bindungen zum PG aufbauen (LppAB) oder über nicht kovalente Wechselwirkungen mit dem PG interagieren (OmpA). Auch in der inneren Membran gibt es eingelagerte Proteine (TolA), die nicht kovalente Bindungen zum PG eingehen (vermittelt über TolB). Diese beiden Proteine bilden darüber hinaus Bindungen zur OM (an Pal gebunden) aus, so dass an diesen Stellen ein enger Kontakt selbst zwischen innerer und äußerer Membran herrscht.²⁹ Es wird angenommen, dass in Bereichen, in denen solche Verknüpfungen nicht existieren, sich die OM ablöst und teilweise als Vesikel abgeschnürt wird. Diese outer membrane vesicles haben verschiedene Funktionen wie den Transfer von DNA, Botenstoffen sowie Toxinen und antimikrobiellen Wirkstoffen. Auch die Übermittlung des für die Initiation einer Symbiose wichtigen Nod Faktors von Rhizobien zu den Wurzeln der Wirtspflanzen wird diskutiert.³⁰

Ein Teil der in der OM eingelagerten Proteine (Porine) bildet Kanäle, die oft durch eine als β -Barrel bezeichnete Konformation gebildet werden. Dabei wird ein mäanderartig aufgebautes β -Faltblatt zu einer Röhre geschlossen. Solche Strukturen erreichen einen Durchmesser von bis zu 4 nm (Protein-Trimere). Einige davon wurden bereits in künstliche Membranen eingebracht und mittels AFM vermessen.³¹

Einige Bakterienarten bilden darüber hinaus zweidimensionale Proteinkristalle auf der Oberfläche, die als Surface-Layer (S-Layer) bezeichnet werden. Der geordnete Aufbau dieser Strukturen hat großes Interesse im Bereich nanobiologischer Forschung mit Blick auf mögliche Anwendungen geweckt.³² Hinsichtlich der biologischen Bedeutung gibt es bislang Beschreibungen der Funktion von S-Layern, die sich auf bestimmte Aspekte einzelner Gruppen von Bakterien fokussieren. Eine allgemeinere Funktion wird mit einer Stabilisierung der Zelle angegeben, wobei dies auch nicht generell gilt.³³ Zur Untersuchung des Aufbaus beispielsweise durch SEM oder AFM werden S-Layer oft von den Bakterien abgelöst und auf eine harte Unterlage aufgebracht. Auch Abbildungen auf getrockneten Bakterien sind möglich,³⁴ wohingegen eine Darstellung durch AFM auf lebenden Bakterien in wässrigem Medium erst 2009 gelang.³⁵ Das hier untersuchte Bakterium *S. meliloti* bildet keine S-Layer aus, so dass die Untersuchungen die äußere Membran darstellen.

Neben dem fest gebundenen LPS können Bakterien auch sogenannte Exopolysaccharide (EPS) bilden. EPS sind mit der Zelloberfläche assoziiert und bilden einen Mantel, der allerdings nur schwach gebunden ist, so dass sich Moleküle ablösen können. Sie bestehen aus repetitiven Einheiten, die bei *S. meliloti* aus einem modifizierten Octasaccharid von Galactose und sieben Glucose-Molekülen bestehen. Dieses ist an dem Aufbau des Infektionskanals in den Wurzelknöllchen beteiligt.³⁶

1.2 Interaktion von Nanopartikeln mit tierischen Zellen

1.2.1 Aufbau und Funktion tierischer Zellen

Tierische Zellen unterscheiden sich von den zuvor beschriebenen Bakterien in vielerlei Hinsicht. Ein wichtiges Kriterium ist das Vorliegen eines Zellkerns (Nucleus), aufgrund dessen sie zu den Eukaryoten zählen. Darüber hinaus verfügen sie über Organellen, die zu einer räumlichen Ordnung und Kontrolle der biochemischen Vorgänge beitragen. Die Zellen sind 10 – 100 µm groß und von einer Lipiddoppelschicht umgeben (Abb. 4). Das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen ist bei Eukaryoten deshalb deutlich kleiner als bei Bakterien. Da viele Reaktionen von membranassoziierten Proteinen katalysiert werden, befinden sich in der Zelle weit ausgehende Membransysteme. Die Oberfläche der Plasmamembran macht daher teilweise nur 10 % der gesamten Membranfläche aus, kann bei einigen Zelltypen aber durch Aus- und Einstülpungen deutlich vergrößert sein, wie es beispielsweise in der Lunge oder dem Darm zum Gas- oder Nährstoffaustausch der Fall ist. Hierin zeigt sich die Spezialisierung einzelner Zellen, die in einem mehrzelligen Organismus eine definierte Funktion wahrnehmen und entsprechend angepasst sind.¹⁸ Der Stoffaustausch mit der Umgebung erfolgt durch bei einigen kleinen Molekülen durch Transportproteine in der PM direkt ins Cytosol, bei größeren Strukturen meist durch das Abschnüren und Einschließen in Membranvesikeln (Endozytose).

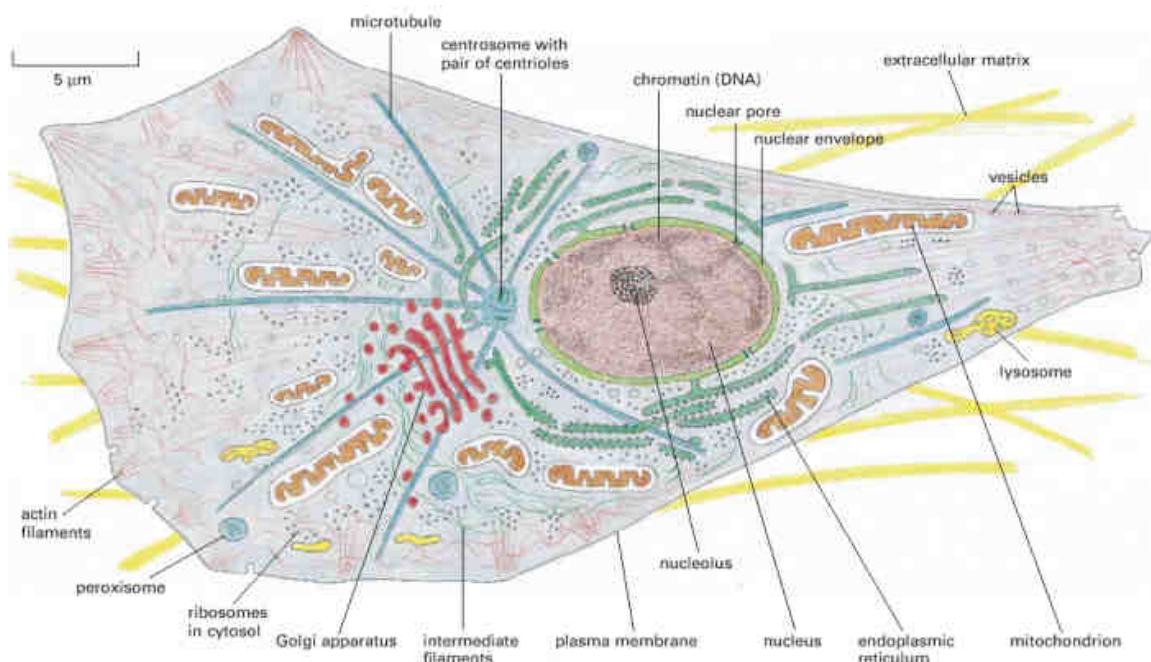


Abb. 4 Schematische Darstellung einer tierischen Zelle. (Aus *Molecular Biology of the Cell*)²¹

Die Morphologie der Zelle wird nicht durch eine Zellwand bestimmt, sondern durch Proteinfilamente des Cytoskeletts, das im Cytosol ein dreidimensionales Gerüst bildet. Die Plasmamembran ist vergleichbar einer flexiblen Zeltplane darüber aufgespannt und an bestimmten Punkten über eingelagerte Proteine mit dem Cytoskelett verbunden. Die Bewegung der Zelle erfolgt durch ein gerichtetes Längenwachstum der Proteinfilamente. An der Kontrolle dieser Vorgänge sind unter anderem die beschriebenen G-Proteine der Rho-Familie beteiligt.^{37,38} Auch Organellen und Vesikel werden entlang des Cytoskeletts transportiert, diffusive Prozesse verlaufen im viskosen Cytoplasma langsam.³⁹ Der Vesikeltransport als Teil der Endozytose wird im folgenden Kapitel eingehender beschrieben,

da er für die Aufnahme gebundener Nanopartikel eine Rolle spielt. Es werden drei Typen von Cytoskelettstrukturen hinsichtlich ihres Aufbaus und der damit korrelierenden Funktion unterschieden:

Mikrotubuli sind Röhren von ca. 25 – 30 nm Durchmesser, die aus Tubulin aufgebaut werden. Die Filamente befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht durch Polymerisation und Depolarisation des Tubulins an beiden Enden. Das sogenannte Minus-Ende ist am Centrosom gebunden, von dem die Mikrotubuli strahlenartig in die Peripherie führen. Da in der Regel am Plus-Ende die Polymerisationsrate und am Minus-Ende die Depolarisationsrate überwiegen, kommt es zu einer Tretmühlen-Bewegung des Filaments von der Peripherie zum Centrosom. So können an den Mikrotubuli gebundene Strukturen in das Zentrum der Zelle transportiert werden. Ein gerichtetes Wachstum der Zelle erfolgt durch Änderung der Polymerisationsraten in den entsprechenden Bereichen. Während der Zellteilung bauen Mikrotuben den Spindelapparat auf, der die zwei Zellkerne voneinander separiert. Daneben bilden sie auch das Gerüst von Zilien, die von spezialisierten Epithelzellen hervorgebracht werden. Zilien stellen Zellfortsätze dar, die teilweise beweglich sein können und in der Lunge Schleim und Partikel aus dem Körper transportieren.¹⁸

Mikrofilamente mit einem Durchmesser von 9 nm werden durch Aktin-Monomere aufgebaut. Während sie in Muskelzellen meist als Aktinfilamente oder kurz als Aktin bezeichnet werden und dort an der Muskelkontraktion beteiligt sind, haben sie allgemein in Zellen neben der Transportfunktion auch Stützaufgaben. Wie die Mikrotubuli besitzen Mikrofilamente ein Plus- und Minus-Ende mit unterschiedlicher Polymerisations- und Depolymerisationsrate. Sie haben ihren Ursprung jedoch nicht an einem zentralen Punkt wie dem Centrosom sondern werden im Cytosol ausgehend von Initiatorproteinen gebildet. Damit können direkt in der Region, in die die Zelle sich bewegen soll, neue Mikrofilamente aufgebaut werden.³⁸ Werden diese miteinander zu einem Netz verbunden, wird die eher flüssige Konsistenz des Cytoplasma gelartig verfestigt. Da diese Netzwerke nahe der Membran liegen, definieren sie die Topographie der Zelloberfläche (in der Funktion sind sie besonders für AFM-Abbildungen von Bedeutung). Sie bilden auch den Ausgangspunkt für Aktinbündel, die an einigen Stellen mit der Membran in engem Kontakt stehen. An diesen Punkten finden sich Proteine (z.B. Integrine), die die Zelle mit der Extrazellulären Matrix verbinden und damit im Gewebe oder auch auf dem Boden eines Kulturgefäßes verankern. Bei der Extrazellulären Matrix handelt es sich ebenfalls um Proteinfilamente (z.B. Collagen) oder daran gebundene Proteine (z.B. Fibronectin), die das Bindegewebe aufbauen. Weiterhin bilden Aktinbündel den strukturellen Kern von Microvilli. Diese schlauchartigen Zellausläufer von etwa 100nm Durchmesser und wenigen µm Länge führen zu der beschriebenen Vergrößerung der Zelloberfläche in der Lunge oder dem Darm und fördern so den Stoffaustausch mit der Umgebung⁴⁰ und können mögliche Bindungsstellen für NP darstellen (Kap. 4.2.3).⁴¹

Intermediärfilamente tragen ihren Namen aufgrund ihres Durchmessers, der mit 10 – 15 nm zwischen den beiden zuvor genannten liegt. Sie können aus unterschiedlichen Proteinen wie Keratin aufgebaut werden. Im Gegensatz zu den beiden anderen Filamenttypen stabilisieren sie die Zelle eher gegenüber Zugkräften, was an den an Keratin reichen Zellen der Haut deutlich wird. Dabei verbinden sie auch benachbarte Zellen zu einem engen Gewebe.¹⁸

1.2.2 Mechanismen der Stoffaufnahme in tierischen Zellen

Die Plasmamembran stellt eine Barriere dar, die eine spezifische Regulation des Stoffaustausches ermöglicht. Zwar haben Gase und kleine lipophile Moleküle die Möglichkeit, die Lipiddoppelschicht zu passieren, elektrisch geladenen Molekülen ist dies aufgrund der unpolaren Struktur des Membraninneren allerdings nicht möglich. Auch größere

Moleküle oder partikuläre Stoffe können die Membran in der Regel nicht passieren. Die Zelle verfügt über verschiedene Transportmechanismen, durch die sie den Stoffaustausch abwickelt und steuert. Man unterscheidet Prozesse, bei denen Stoffe direkt in das Cytoplasma gelangen und Aufnahmewege, bei denen sie zuvor in einem Membranvesikel eingeschlossen werden (Endocytose). Erstere verlaufen über Kanalproteine und Carrier, die Ionen und kleine Moleküle passiv aufgrund eines Konzentrations- oder Potentialgradienten passieren lassen bzw. aktiv unter Energieumsatz (ATP-Hydrolyse) in das Cytosol transportieren und dort anreichern. Durch diesen aktiven Transport von Ionen wird beispielsweise das Membranpotential aufgebaut und reguliert. Die Dimensionen der Transportproteine limitiert die Größe der aufzunehmenden Stoffe. Zudem kann es sinnvoll sein, das Material im Cytosol lokal zu konzentrieren und weiter zu verarbeiten. Das wird durch die Endocytose ermöglicht, bei der das aufzunehmende Material durch die PM umschlossen wird (Abb. 5). So können spezialisierte Zellen des Immunsystems ganze Bakterien und sogar Körperzellen aufnehmen (Phagozytose) und in einem Vesikel eingeschlossen abbauen. Anhand von TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen hat man auch aufgenommene NP gefunden, die von einer Membran umgeben im Cytosol vorliegen. Es ist daher anzunehmen, dass sie über Endocytose in die Zelle gelangen. Allgemein existieren verschiedene endocytotische Mechanismen, an denen jeweils charakteristische Proteine beteiligt sind.⁴²

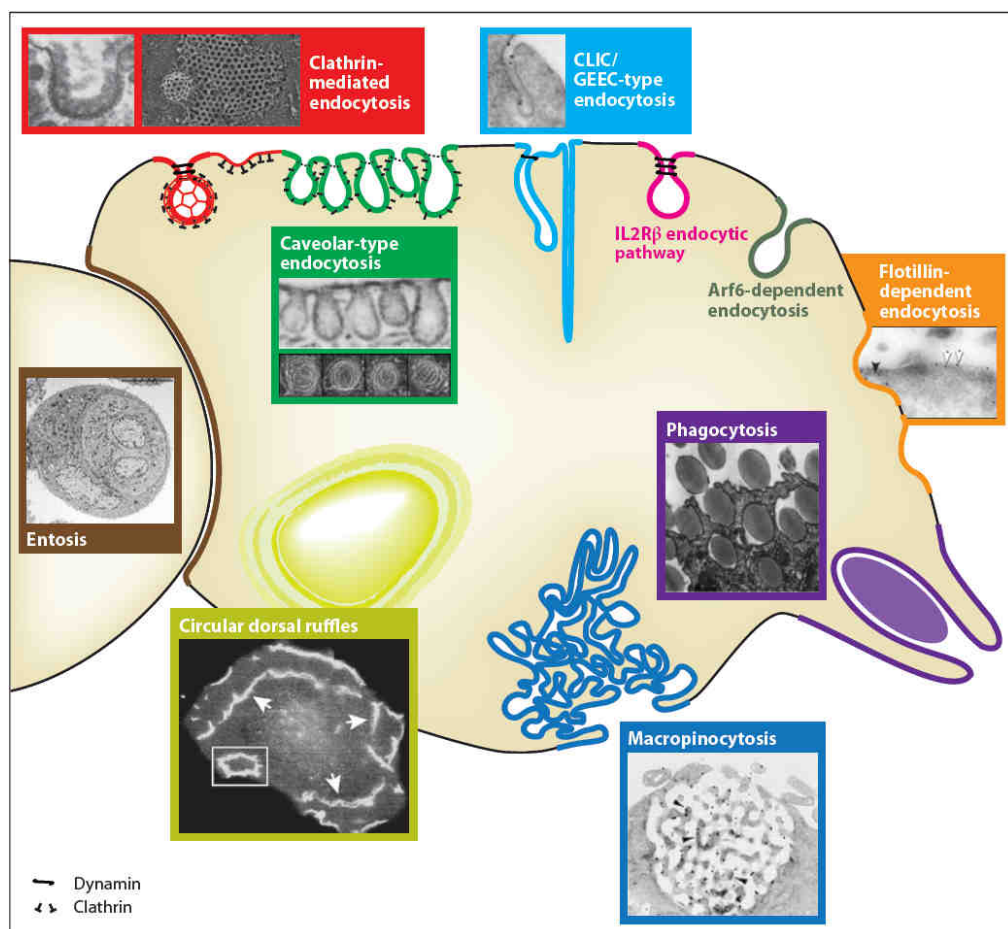


Abb. 5 Verschiedene Mechanismen der Endocytose. (Aus Doherty et al. 2009)⁴³

Ein für die Endocytose notwendiger Schritt ist die Bindung des Moleküls oder Partikels an der PM. Dies geschieht meist über Rezeptoren, die die Aufnahme stimulieren. Für einige Stoffe ist bislang nur ein einzelner Endocytose-Mechanismus bekannt, bei anderen sind verschiedene alternative Wege nachgewiesen.⁴³

Von großer Bedeutung und gut untersucht ist die Clathrin-vermittelte Aufnahme (Abb. 5 rot). Dieses Protein ordnet sich zu Triskelions zusammen, die sich während der Abschnürung um den Vesikel lagern und dabei ein hexagonales Gitter formen (clathrin-coated vesicle), das die Krümmung der Membran unterstützt. Schon an der PM finden sich Vorstufen der Vesikel als Vertiefungen (clathrin-coated pits), in denen sich verschiedene Membranrezeptoren konzentrieren. Die Beteiligung des Clathrin lässt sich elektronenmikroskopisch anhand der typischen Struktur wie auch durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisen. Die Clathrinhülle kann später wieder dissoziieren und gibt die Membranvesikel frei. Auch von intrazellulären Membransystemen können nach diesem Verfahren Vesikel gebildet werden.⁴³

Ein weiterer wichtiger Mechanismus basiert auf den als Caveolae bezeichneten flaschenförmigen Einbuchtungen der PM (Abb. 5 grün). Sie zeichnen sich durch eine Anreicherung des Proteins Caveolin sowie von Cholesterol und Sphingolipiden in der Membran aus.⁴³ Solche und ähnliche Lipid-Mikrodomänen begründen das Konzept der Lipid Rafts. Hier geht man davon aus, dass in den Domänen eine andere Lipidkonformation vorliegt und sie damit gewissermaßen als Flöße in der übrigen Membran schwimmen. So können Membranproteine dauerhaft in räumlicher Nähe zueinander vorliegen und miteinander interagieren.⁴⁴

Ein gemeinsames Charakteristikum der Mechanismen ist die lokale Häufung von Rezeptoren in Membranbereichen. Dies erhöht die Bindungswahrscheinlichkeit in Arealen, die für die Endocytose prädestiniert sind. Eine Differenzierung, über welchen der möglichen Aufnahmewege ein bestimmtes Objekt endocytotiert wird, kann durch Inhibition des jeweiligen Mechanismus erfolgen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass ein solcher Eingriff die normalen Vorgänge in der Zelle drastisch beeinflussen kann, da auch die Zufuhr anderer Stoffe blockiert wird.⁴³ Hinsichtlich der Aufnahme von NP folgt daraus, dass verschiedene Eigenschaften der NP sich auf die Aufnahmemechanismen auswirken. Beispielsweise entscheidet die Größe von Latex-Kügelchen, ob die Beads über Clathrin-vermittelte Endocytose (\varnothing 50 – 200 nm) oder durch Caveolae (\varnothing > 500 nm) aufgenommen werden (untersucht an Hautkrebszellen der Maus).⁴⁵ Weitere Einflussgrößen, die die Wechselwirkung von NP und der Zelloberfläche beeinflussen, werden im folgenden Kapitel dargelegt.

Intrazellulär können Vesikel entlang von Microtubuli transportiert werden. Als Motorproteine fungieren dabei Kinesine in Richtung auf das Plus-Ende und Dynein in Richtung auf das Minus-Ende. Auch Aktinfilamente bilden Transportwege, wobei die Bewegung hier durch Myosine bewirkt wird. Die Geschwindigkeiten liegen bei ca. 1 $\mu\text{m/s}$ entlang von Microtubuli und 0,1 $\mu\text{m/s}$ entlang von Actinfilamenten.⁴⁶

1.2.3 Herstellung von Nanopartikeln

Eine gebräuchliche Definition von Nanopartikeln besagt, dass es sich um Körper handelt, die in mindestens einer Dimension 1 – 100 nm messen (Moleküle, die auch in diesem Bereich liegen, werden jedoch ausgenommen). Aufgrund der geringen Größe kommt es zu einem drastischen Anstieg des Verhältnisses der Oberfläche zum Volumen der Partikel. Die Partikel verändern und gewinnen neue Eigenschaften, die sich mitunter stark von dem des Materials unterscheiden, wenn dieses in makroskopischen Einheiten vorliegt.⁴⁷ Diese spezifischen Effekte haben NP zu einem stark beachteten Forschungsobjekt (Quantenpunkte, magnetische NP, Fullerene und Kohlenstoffnanoröhrchen, um nur einige zu nennen) gemacht. Nanopartikel und Nanostrukturen sind inzwischen vielfach zu Anwendungen in der Industrie bis hin zum Einsatz in alltäglichen Bereichen gekommen, so dass die Nanotechnologie heute

einen wichtigen Beitrag zur Lebensqualität wie auch zur ökonomischen Situation leistet.[°] Diese Bedeutung wird weiter zunehmen, so dass das Weltmarktvolumen nano-optimierter Produkte im Jahr 2015 auf 3 Billionen \$ geschätzt wird.⁴⁸

Für die Produktion von NP werden mehrere Verfahren eingesetzt, die entweder einen Aufbau der Partikel aus kleineren Vorläufermolekülen (bottom-up) oder eine Zerkleinerung makroskopischen Materials (top-down) beinhalten.^{47,49} Zwei wichtige Methoden, durch die die im Rahmen des NanoCare-Projektes untersuchten NP hergestellt wurden, sind die Gasphasen Pyrolyse und ein naßchemisches Fällungsverfahren. Bei der Gasphasen Pyrolyse werden metallorganische Precursormoleküle als Dampf bei hohen Temperaturen (ca. 1500 °C) zersetzt. Dabei kommt es zu einer Nucleation der entstehenden Metalloxide und einem Wachstum der gebildeten Partikel. Über die Temperatur und Verweilzeit des Materials lässt sich die Größe der Primärpartikel kontrollieren. Aufgrund der hohen Temperatur sind Sinterungsprozesse möglich, durch die sich Primärpartikel, die in Kontakt zueinander kommen, Aggregate bilden. Solche Einheiten lassen sich durch schonende Verfahren (Dispergierung in Flüssigkeit + Ultraschallbehandlung oder Rühren) nicht wieder trennen. Auch die Entstehung von Agglomeraten ist möglich. Dabei handelt es sich um Primärpartikel oder Aggregate, die durch schwache attraktive Wechselwirkungen zusammengehalten werden und sich durch die genannten Verfahren wieder zerlegen lassen.

Bei der nasschemischen Synthese werden die gelösten Precursoren einer kontrollierten Fällungsreaktion unterworfen. Die Reaktion kann durch die Konzentration der Reaktanden, die Temperatur und den Druck gesteuert werden. Die Zugabe von Stabilisatoren ermöglicht es, eine Agglomeration weitgehend zu verhindern. Hierzu werden organische Moleküle wie beispielsweise PEG oder verwandte Polyoxasäuren eingesetzt, die an der Partikeloberfläche binden.^{47,50}

1.2.4 Interaktion von Nanopartikeln mit biologischen Systemen

Für die Wechselwirkungen von NP mit biologischem Material sind drei Aspekte von Bedeutung.

- Die Oberfläche des Partikels, die durch die physikochemischen Eigenschaften des Materials bedingt sind
- Die Grenzschicht zwischen dem Partikel und dem umgebenden flüssigen Medium
- Die Kontaktzone zwischen dem Partikel inklusive seiner Grenzschicht sowie der Oberfläche der biologischen Zelle

Hinsichtlich der Eigenschaften des Partikels selbst sind hier die die Form, die Fläche und die Rauigkeit des Partikels, seine chemische Zusammensetzung und Kristallinität, funktionelle Gruppen, elektrische Ladungen und Liganden sowie die Hydrophilie hervorzuheben. Zusammen mit Parametern der umgebenden Flüssigkeit wie dem pH-Wert, der Ionenstärke (insbesondere mehrwertige Ionen), der Temperatur, der Art und Konzentration gelöster Proteine und Detergenzien werden dadurch Charakteristika definiert, die die Grenzschicht und damit das Verhalten der Dispersion bestimmen. Dabei handelt es sich um das zeta-Potential, die Hydratation und die Interaktion mit Ionen in der elektrischen Doppelschicht sowie mit adsorbierten organischen Molekülen. Neben den biologischen Implikationen haben diese Effekte einen großen Einfluss auf die Stabilität der Dispersion, da sie die Agglomeration der Partikel kontrollieren. Attraktive Van-der-Waals Wechselwirkungen führen zu einer

[°] Beispiele: TiO₂ in Sonnenschutzmitteln, Hydroxylapatit in Zahncreme, SiO₂ und Carbon Black (Ruß) in Autoreifen, CeO₂ als Poliermittel für Wafer

Zusammenlagerung der NP, wenn sie nicht durch repulsive Kräfte kompensiert werden. Diese können elektrostatischer Natur sein, was durch die DLVO-Theorie beschrieben wird.⁵¹ Hier spielen das zeta-Potential und die Ionenstärke eine entscheidende Rolle: Man kann als Abschätzung annehmen, dass bei einer niedrigen Ionenstärke (<100 mM) ein zeta-Potential im Betrag von 30 mV nötig ist, um eine Agglomeration von NP zu verhindern.

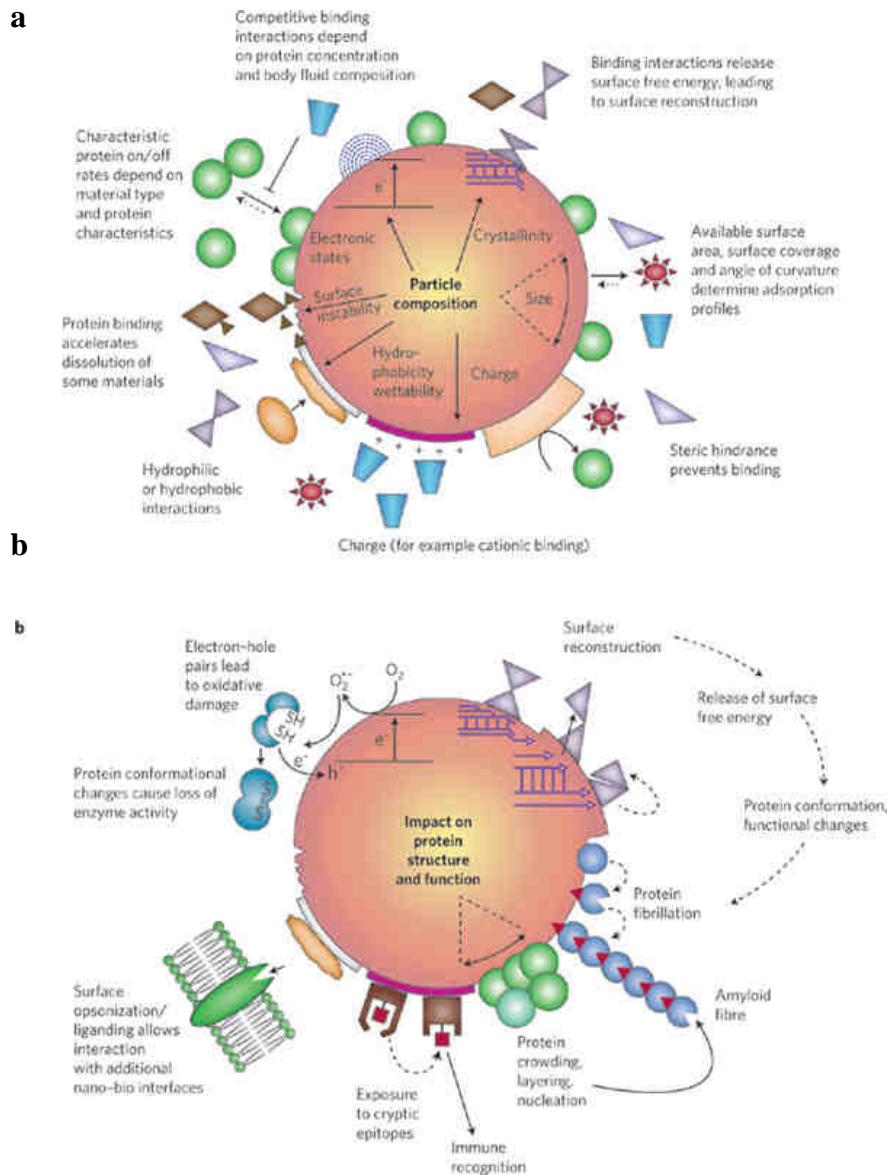


Abb. 6 Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Biomolekülen: Eigenschaften des NP beeinflussen die Modalität der Interaktion (a), daraus ergeben sich mögliche Veränderungen der gebundenen Moleküle mit Folgen für den Organismus (b). (Aus Nel et al. 2009)⁵¹

Daneben spielen sterische Effekte, die durch adsorbierte Moleküle (Stabilisatoren aus dem Herstellungsprozess wie auch Moleküle aus dem Medium) hervorgerufen werden, eine wichtige Rolle. Die Freiheitsgrade ihrer Konformation werden durch die Agglomeration eingeschränkt, so dass sie eine Dispersion einzelner Partikel aufgrund der Entropie stabilisieren.⁵² Diese Effekte haben einen entscheidenden Einfluss auf die Größe und Form der NP-Strukturen, mit denen eine biologische Zelle tatsächlich in Kontakt kommt. Selbst Material, das durch den Herstellungsprozess in Form einzelner nanoskaliger Primärpartikel erzeugt wird, kann in einem biologischen System oder unter den jeweiligen Testbedingungen

in Agglomeraten von mehreren μm Durchmesser vorliegen.^f Wie am Beispiel der Endocytose von Polymerpartikeln unterschiedlicher Größe gezeigt wurde, ergeben sich daraus deutliche Differenzen in der Interaktion mit lebenden Zellen.⁴⁵

Die dritte Ebene biologischer Interaktionen wird durch die Oberflächenstruktur der Zelle beeinflusst. Die Lipidmembran ist nicht homogen, sondern wird von eingelagerten Proteinen unterbrochen, die ihr eine Heterogenität in Längsbereichen von 10 – 50 nm verleihen.⁵¹ Ein sehr effektiver Aufnahmeweg führt über die spezifische Bindung an Rezeptoren. Hierin liegt großes Potential für die gezielte Einbringung von therapeutischen Materialien vermittelt durch NP, die entsprechende Liganden an der Oberfläche tragen (Drug-Carrier^g).⁵⁴ Es gibt Berichte, dass bestimmte Membranproteine an der Bindung der NP selbst beteiligt sind,^{55,56} wobei die zugrunde liegenden Mechanismen aufgeklärt werden müssen, bevor die Aussage auf NP im Allgemeinen erweitert werden kann. Auch wenn nicht in jedem Fall sicher ist, ob Proteine eine direkte Erkennung und Bindung des jeweiligen Partikels bewirken, können sie unspezifische Wechselwirkungen mit dessen Oberfläche beeinflussen. Hier spielen elektrostatische Interaktionen eine Rolle,⁵⁷ da die Plasmamembran eine negative Nettoladung aufweist, die unter anderem durch sialinsäurehaltige Glycoproteine und Glycolipide aufgebaut wird. Weiterhin kommt der Gestalt der Partikel eine Bedeutung zu, da sowohl kleine Rauigkeiten die Aufnahme fördern als auch die Größe der Partikel selbst wichtig ist. So wurde eine optimale Größe festgestellt, die eine rasche Aufnahme erlaubt und abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit wie auch der Geometrie der Partikel ist.⁵¹

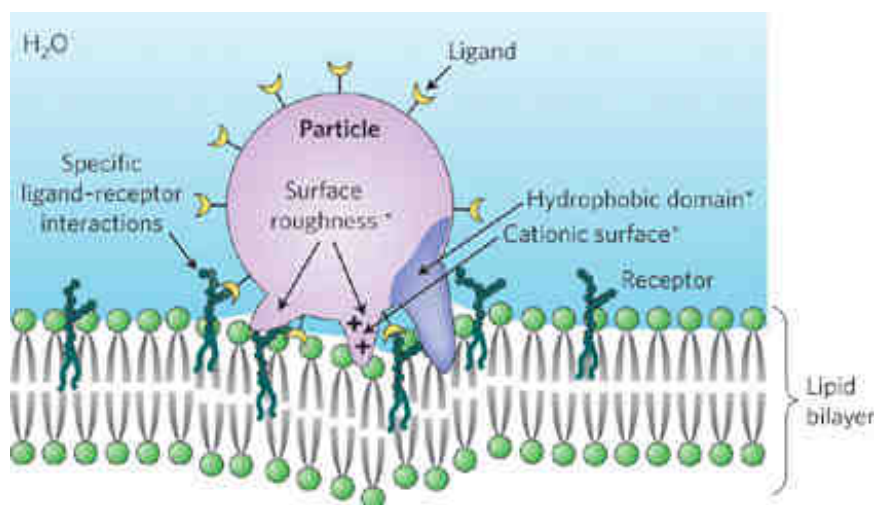


Abb. 7 Wechselwirkungen zwischen einem NP und der Zellmembran. (Aus Nel et al. 2009)⁵¹

^f Biologische Tests werden in der Regel in wässrigen Puffern und Zellkulturmedien durchgeführt, um optimale Bedingungen für die Zellen zu schaffen. Sie weisen eine Ionenstärke von ca. 150 mM auf und enthalten verschiedene mehrwertige Ionen. Diese können Partikelladungen kompensieren und ggf. benachbarte Partikel verbrücken. Kulturmedien werden oft mit FCS (fötales Kälberserum) versetzt, das eine große Anzahl verschiedener Proteine beinhaltet, die an der Partikeloberfläche adsorbieren können.⁵³

^g Beispielsweise wird die Verwendung von Kohlenstoffnanoröhrchen zu diesem Zweck seit 2006 im Rahmen des EU-weiten Projektes Carbio untersucht. Da dazu die gleichen Konzepte und Methoden zum Einsatz kommen, wie in der vorliegenden Arbeit, wird deutlich, dass die hier erarbeiteten Ergebnisse und Prinzipien nicht auf toxikologische Untersuchungen von NP beschränkt bleiben, sondern vor einem breiteren Hintergrund zu sehen sind.

2 Physikalische Messtechniken

2.1 FCS

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) wurde Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts als ein physikalisches Verfahren entwickelt, dessen Anwendung auf biologische Untersuchungen ausgelegt ist.⁵⁸ Technische Weiterentwicklungen ermöglichten eine verbesserte Anwendbarkeit und steigerten die Bedeutung der Methode in der Forschung. In der heutigen Form wird die hohe Selektivität der Fluoreszenz gepaart mit sensitiven Detektoren eingesetzt, um Signale bis hinab auf die Ebene einzelner Moleküle zu analysieren. Das wird durch das kleine Messvolumen konfokaler Mikroskopie ermöglicht. Somit lassen sich aus den Schwankungen der Fluoreszenzintensität wichtige Informationen gewinnen, welche in makroskopischen Systemen durch die wegen der großen Teilchenzahl notwendige Mittelwertbildung nicht zugänglich sind.

Ein entscheidendes Kriterium der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist die Anzahl der detektierten Fluorophore. Mit Entwicklung der konfokalen Mikroskopie konnte das Messvolumen auf unter 1 fl gesenkt werden, worin sich bei geeigneter Verdünnung der Messlösung von ca. 0.1 – 100 nM etwa 0.2 – 40 Fluorophore befinden.⁵⁹ Es wird zwar die Gesamtintensität der Fluoreszenz gemessen, aber wegen des hohen Anteils einzelner Fluorophore an diesem Signal erlaubt die statistische Analyse der zeitaufgelösten Intensitätsschwankungen, auf Eigenschaften einzelner Moleküle zu schließen. Aus diesem Grund kann man die Bezeichnung Einzelmolekülspektroskopie für die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wählen.

Durch FCS lassen sich vielfältige Informationen erhalten, von denen die wohl wichtigste die charakteristische Diffusionszeit τ_D eines Moleküls durch das konfokale Volumen ist. Sie ist von dem Diffusionskoeffizienten abhängig und damit ein Maß für die Größe und Form des Moleküls. Vorgänge, die eine hinreichend große Veränderung der molekularen Gestalt bewirken, sind damit messbar. Dazu gehören z.B. die Agglomeration von Proteinen und wohl bedeutender die Bindung anderer Moleküle oder Partikel.

Die Detektionsgrenze wird mit einem Unterschied der Diffusionszeiten im Bereich eines Faktors von 1,6 – 2 angegeben.⁶⁰ Das entspricht einem 4 bis 8-fachen Massenunterschied bei sphärischer Geometrie der Interaktionspartner. In diesem Fall sollte der Anteil einer Spezies mindestens 10 % der detektierten Moleküle betragen, um eine Analyse zu erlauben. Mit steigender Differenz der Diffusionszeiten sinkt diese Schwelle.

Diese Limitierung ist durch Markierung beider Interaktionspartner mit Fluorophoren unterschiedlicher Emissionswellenlänge und Kreuzkorrelationsanalyse des Fluoreszenzsignals zu überwinden. Diese Methode erlaubt zudem eine Verkürzung der Messdauer, was sie für Screenings z.B. in der Pharmaindustrie interessant macht. Weiterhin wird so eine Analyse intrazellulärer Untersuchungen vereinfacht. Dort kann eine abnormale Diffusion durch die hohe Konzentration weiterer Moleküle und Kompartimente auftreten, was mit dem üblicherweise eingesetzten Modell der freien Diffusion nicht beschrieben wird. Für diese Anwendung ist insbesondere der Einsatz der 2-Photonen-Anregung sinnvoll, deren langwellige Strahlung weiter in Gewebe eindringen kann. Wegen des oftmals breiten Absorptionsspektrums der Farbstoffe ist es in diesem Fall möglich, unterschiedliche Fluorophore mit einem einzigen Laser anzuregen und so den apparativen Aufwand zu verringern.

Neben der Autokorrelationsanalyse sind auf das Fluoreszenzsignal andere Verfahren zur Informationsgewinnung anwendbar. Die molekulare Helligkeit und Fluoreszenzlebensdauer können Aufschluss über die Umgebung des Farbstoffs geben und werden durch die Methoden des Photon Counting Histogram (PCH) und Fluorescence Intensity Distribution Analysis (FIDA) bzw. Fluorescence Intensity and Lifetime Distribution Analysis (FILDA) und Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) genutzt.⁶¹⁻⁶³

2.1.1 Fluoreszenz

Absorbiert ein Molekül ein Photon entsprechender Energie, wird ein Elektron aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in den S_1 -Zustand angeregt. Diese Energie kann unter anderem durch Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben werden. Das emittierte Licht ist dabei im Vergleich zum Anregungslicht rotverschoben (Stokes Shift), da ein Teil der Energie im angeregten Zustand strahlungslos z.B. durch Interaktion mit der Umgebung abgegeben wird. Die Zeit zwischen Absorption und Emission wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und durch den Fluorophore und seine Umgebung bestimmt. Sie liegt für organische Farbstoffe im Bereich von einigen Nanosekunden, so dass theoretisch Emissionsraten von etwa 100 MHz möglich sind.

Neben der Fluoreszenz können weitere Effekte auftreten, welche in einem Jablonski-Diagramm dargestellt sind:

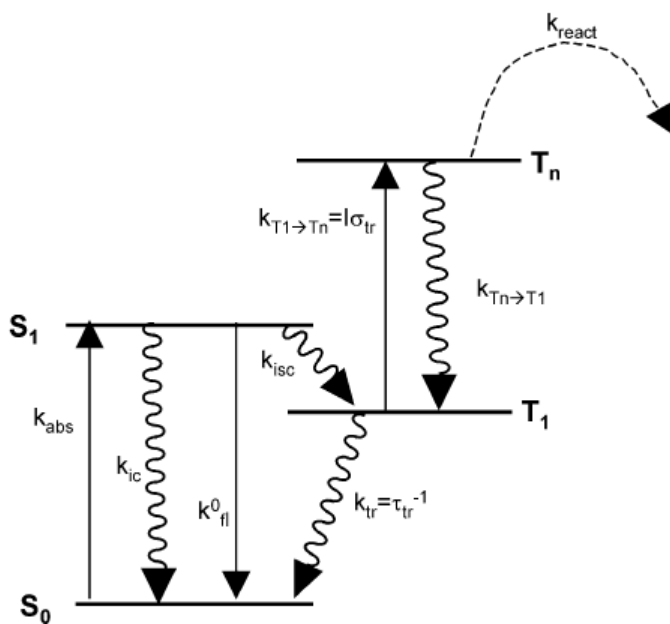


Abb. 8 Jablonski-Diagramm. Durch die Absorption eines Photons (k_{abs}) gelangt ein Molekül aus dem S_0 in den S_1 -Zustand, den es u. a. durch Fluoreszenz in den S_0 -Zustand (k_{fl}^0) oder durch Intersystem Crossing (k_{isc}) in den ersten Triplettzustand T_1 verlassen kann.

Ein Übergang aus dem S_1 in den niedrigsten Triplettzustand T_1 wird als Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet. Da er quantenmechanisch verboten ist, tritt er nur selten auf (ca. 1 mal pro $10^5 - 10^6$ absorbierten Photonen).⁶¹ Die Triplettlebensdauer liegt allerdings im Bereich von Mikrosekunden, daher kann der Anteil der Fluorophore in diesem Zustand besonders bei hoher Anregungsintensität beträchtlich sein. Für Fluoreszenzmessungen ist ein niedriger

Tripletanteil aus zwei Gründen wünschenswert: Einerseits tragen Moleküle in diesem Stadium nicht zur Fluoreszenz bei, andererseits nimmt man an, dass photodegradative chemische Reaktionen (Photobleaching) vor allem im Tripletzustand stattfinden.⁶⁴ Neue Fluoreszenzfarbstoffe werden auf einen kleinen Tripletanteil und hohe Photostabilität optimiert, was besonders für die Einzelmolekülspektroskopie notwendig ist.

Ein anderer Prozess, der die Fluoreszenzquantenausbeute verringert wird als Fluoreszenzlöschung oder Quenching bezeichnet. Man unterscheidet zwischen statischem Quenching, bei dem der Fluorophor im Grundzustand einen nicht fluoreszierenden Komplex mit einem weiteren Molekül bildet, sowie dynamischem Quenching durch Stöße mit anderen Molekülen. In biologischen Systemen sind vor allem die Aminosäure Tryptophan und die Base Guanin sowie molekularer Sauerstoff als mögliche Quencher von Bedeutung.⁶⁵

Weiterhin kann die Fluoreszenz durch den FRET-Effekt beeinflusst werden. Bei diesem durch Förster beschriebenen Vorgang wird die absorbierte Energie strahlungslos auf ein benachbartes Molekül übertragen, dessen Absorptionsspektrum mit der Fluoreszenzwellenlänge korrespondiert.⁶⁶ Sowohl Quenching wie auch FRET werden analytisch eingesetzt, da sie sehr entfernungs sensitiv sind.

2.1.2 Konfokale Mikroskopie

Um Einzelmolekülspektroskopie in Lösungen betreiben zu können, ist ein kleines Detektionsvolumen notwendig, in dem sich nur wenige Analytmoleküle befinden. Für ein ausreichend hohes Messsignal müssen diese Moleküle mit einer großen Energiedichte angeregt werden. Beides wird durch die konfokale Mikroskopie ermöglicht: Ein anregender Laserstrahl wird durch ein Objektiv hoher Numerischer Apertur ($NA > 0.9$) auf ein durch Beugung limitiertes Volumen fokussiert und erzeugt hier eine hohe Energiedichte. Im Epifluoreszenzmodus wird das emittierte Licht von demselben Objektiv gesammelt und über dichroitische Spiegel und Filter auf ein Pinhole abgebildet und die passierenden Photonen von einem Detektor registriert. Das Pinhole ist nur für Strahlen permeabel, deren Quelle in einem eng begrenzten Bereich entlang der optischen Achse liegt. Damit wird die Auflösung optischer Mikroskope von wenigen hundert nm in der xy-Ebene um eine Auflösung in der z-Achse im μm Bereich erweitert.

Die Anregungs- und Detektionsvolumina sind bei diesem Aufbau idealerweise deckungsgleich, in jedem Fall sollte das Detektionsvolumen das Anregungsvolumen umschließen, um ein vorzeitiges Bleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Die Form des Anregungs- bzw. Detektionsvolumens, auch als effektives Volumen V_{eff} bezeichnet, ist ellipsoid und wird durch den Strukturparameter S als Quotient der halben langen Achse z_0 und der halben kurzen Achse r_0 beschrieben. Dabei geht man von einem dreidimensionalen gaußförmigen Emissionsprofil aus, dessen Intensität axial bei $z = z_0$ und lateral bei $r = r_0$ auf $1/e^2$ abfällt (anstelle von r und z wird in der Literatur häufig die Bezeichnung ω_1 bzw. ω_2 verwendet). Diese Parameter sind auch für die Autokorrelationsanalyse von Bedeutung.

Aus der Autokorrelationsfunktion ist die apparente Teilchenzahl im effektiven Volumen bestimmbar und damit eine Möglichkeit zur Konzentrationsmessung gegeben. Zudem erlaubt sie, V_{eff} zu berechnen, wozu der Diffusionskoeffizient D des Fluorophors bekannt sein muss.

Unter Verwendung von

$$r_0 = \sqrt{4 \cdot D \cdot \tau_D} \quad \text{Formel 1}$$

wird r_0 berechnet. Damit beträgt das effektive Volumen

$$V_{eff} = \frac{4}{3} \pi (4D\tau_D)^{\frac{3}{2}} \cdot S \quad \text{Formel 2}$$

2.1.3 Autokorrelation

Mit Hilfe des mathematischen Verfahrens der Autokorrelation wird ein Signal – in diesem Fall die Fluoreszenzintensität F – hinsichtlich seiner Selbstähnlichkeit nach einer bestimmten Zeit τ analysiert. Schwankungen der Fluoreszenzintensität δF können von Änderungen der Konzentration δC (z.B. durch Diffusion) sowie Unterschieden der molekularen Helligkeit $\delta \eta$ der Fluorophore (bedingt durch Triplett-Übergänge, Quenching, FRET oder Photobleaching) herrühren.

Aus dem Fluoreszenzsignal wird die Autokorrelationsfunktion (ACF) berechnet und anschließend ein mathematisches Modell angepasst, aus dem sich charakteristische Zeitkonstanten τ_i sowie die apparente Teilchenzahl N abgelesen lassen (Abb. 9).

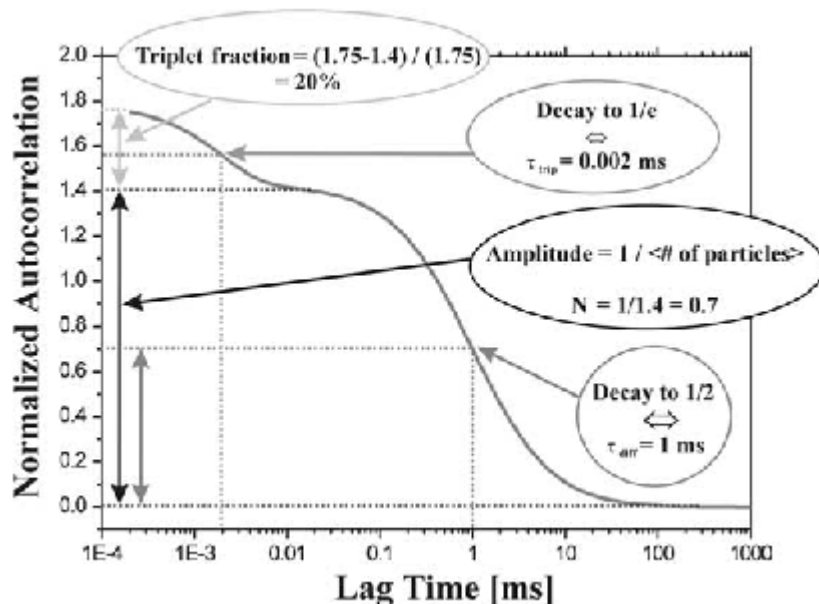


Abb. 9 Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit der Zeit τ . Die Amplitude des diffusionsbasierten Bereichs ($\tau > 0.01$ ms) entspricht der reziproken apparenten Molekülanzahl N , am Halbpunkt (1 ms) ist die Diffusionszeit τ_D ablesbar. Die relative Veränderung der Amplitude im triplettbasierten Bereich gibt den Anteil der Moleküle in diesem Zustand an, dessen Lebensdauer nach einem Abfall auf 1/e gegeben ist. (aus Hausteil et al. 2003)⁶⁷

Da die photophysikalischen Effekte in einem kürzeren Zeitbereich stattfinden als die Diffusion, können sie getrennt behandelt werden. Die folgenden Betrachtungen gelten daher für eine konstante molekulare Helligkeit.

Fluktuationen der Fluoreszenzintensität resultieren aus Veränderungen der Konzentration $C(\underline{r}, t)$ im effektiven Volumen und sind gegeben durch:

$$\delta F(t) = \int_V W(\underline{r}) \cdot \delta(\eta C(\underline{r}, t)) dV \quad \text{Formel 3}$$

Hierbei ist η die molekulare Helligkeit (auch counts per molecule – cpm – bezeichnet) eines Fluorophors, die das Produkt aus der gerätebedingten Anregungsintensität I und gesamten Detektionseffizienz κ , sowie der vom Fluorophor abhängigen Größen Absorptionsquerschnitt q und Fluoreszenzquantenausbeute σ darstellt.

Die räumliche Verteilungsfunktion $W(\underline{r})$ kombiniert die optische Transferfunktion des anregenden Lichts $I(\underline{r})/I_0$, für das ein gaußförmiges Strahlprofil angenommen wird mit der Collection Efficiency Function (CEF), die von den Eigenschaften des Objektivs und des Pinholes bestimmt wird. $W(\underline{r})$ wird häufig durch eine dreidimensionale Gaußverteilung beschrieben, die lateral bei $r = r_0$ und entlang der optischen Achse bei $z = z_0$ auf $1/e^2$ absinkt (Abb. 10).

$$W(\underline{r}) = e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \quad \text{Formel 4}$$

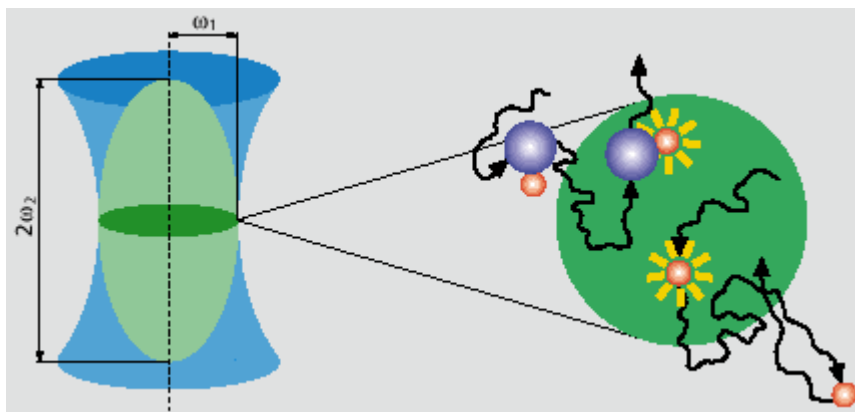


Abb. 10 Detektionsvolumen des FCS: Strahlprofil im Fokusbereich (blau), effektives Volumen (grün) gekennzeichnet durch Halbachsen ω_1 und ω_2 (links). Fokusebene mit $z = 0$, $r = \omega_1$, Moleküle diffundieren durch den Laserfokus, fluoreszierende Moleküle (orange Kugeln) liegen frei und gebunden an Rezeptor (blaue Kugeln) vor (rechts).

Die normierte Autokorrelationsfunktion wird geschrieben als

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{Formel 5}$$

Dabei bedeuten eckige Klammern eine zeitliche Mittelung. $G(\tau)$ gibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals nach der Zeit τ an, was Abb. 11 zum Ausdruck bringt.

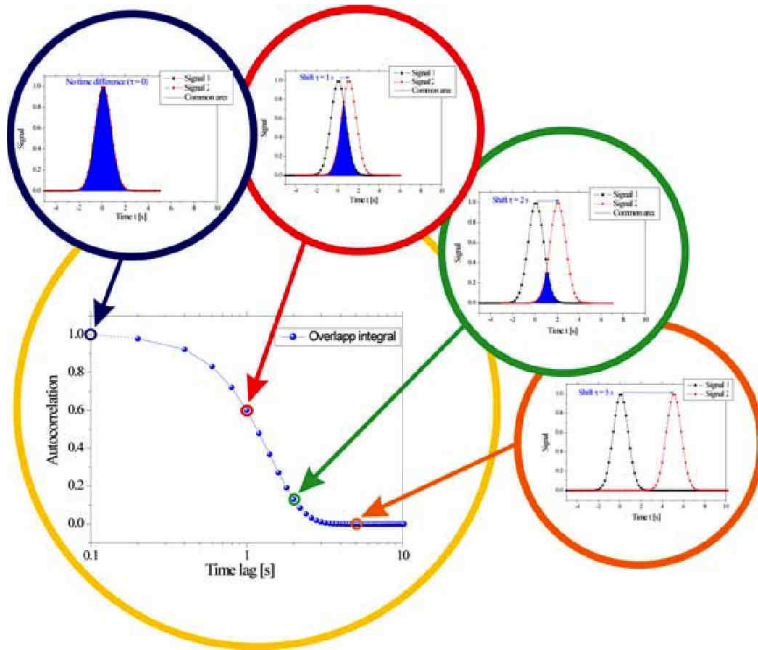


Abb. 11 Selbstähnlichkeit des korrelierten Signals. Großer Kreis: ACF als Funktion der Zeit τ . Kleine Kreise: Überlappungsintegral zweier Fluoreszenzsignale mit einer zeitlichen Differenz τ ; mit zunehmendem τ sinkt die Selbstähnlichkeit. (aus Schwille et al. 2000)⁶⁸

Die Kombination von Formel 3 und Formel 5 ergibt bei konstanter molekularer Helligkeit ($\delta\eta = 0$):

$$G(\tau) = \frac{\iint W(\underline{r})W(\underline{r}') \langle \delta C(\underline{r}, 0) \delta C(\underline{r}', \tau) \rangle dV dV'}{\langle C \rangle \left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2} \quad \text{Formel 6}$$

Die Position des Fluorophors verändert sich dabei von \underline{r} am Zeitpunkt $t = 0$ zu \underline{r}' zum Zeitpunkt $t = \tau$. Lässt man nur freie Diffusion beschrieben durch den Diffusionskoeffizienten D als Ursache von Konzentrationsänderungen zu, ergibt sich der Autokorrelationsterm der Teilchenzahldichte:

$$\langle \delta C(\underline{r}, 0) \delta C(\underline{r}', \tau) \rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}} \quad \text{Formel 7}$$

Die Kombination von Formel 6 und Formel 7 führt zu

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle (4D\tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot \frac{\iint W(\underline{r})W(\underline{r}') \cdot e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}} dV dV'}{\left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2} \quad \text{Formel 8}$$

Die bereits genannte Diffusionszeit τ_D , die ein Molekül im Mittel für die laterale Diffusion durch das effektive Volumen benötigt, hängt nach Formel 9 von dem konstanten Diffusionskoeffizienten und der gerätebedingten Länge r_l ab.

$$\tau_D = \frac{r_l^2}{4D} \quad \text{Formel 9}$$

Das effektive Volumen ist durch die räumliche Verteilungsfunktion $W(\underline{r})$ gegeben.

$$V_{\text{eff}} = \frac{\left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2}{\int W(\underline{r})^2 dV} = \frac{\left(\int e^{-2\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} dV \right)^2}{\int e^{-4\frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-4\frac{z^2}{z_0^2}} dV} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0 = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^3 \cdot S \quad \text{Formel 10}$$

In einem System aus n verschiedenen Komponenten k (z.B. freier und gebundener fluoreszierender Ligand, $n = 2$) tragen diese entsprechend ihrem Molenbruch m_k zum Autokorrelationssignal bei. Unter Einbeziehung von Formel 9 und Formel 10 ist die Autokorrelationsfunktion dann gegeben durch:

$$G(\tau) = \frac{1}{\sum_1^n V_{\text{eff}} \langle C \rangle m_k} \cdot \sum_1^n \left(m_k \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,k}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{D,k}}}} \right) \quad \text{Formel 11}$$

Der erste Term der Funktion entspricht der reziproken Anzahl detektierter Moleküle N im effektiven Volumen und kann aus der Amplitude $G(\tau=0)$ abgelesen werden (Formel 12). Bei bekanntem V_{eff} sind damit Konzentrationsmessungen in lokal begrenzten Bereichen und gegebenenfalls auch innerhalb von Zellen möglich.

$$G(0) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} = \frac{1}{N} \quad \text{Formel 12}$$

In Mehrkomponentensystemen kann mit Hilfe der ebenfalls aus der Analyse erhältlichen m_k -Werte die jeweilige Konzentration und im Falle einer Ligand-Rezeptor-Interaktion der Bindungsgrad bestimmt werden.

Von den photophysikalischen Effekten ist der Triplet-Übergang von allgemeiner Bedeutung, die übrigen Effekte sind weitgehend abhängig vom jeweiligen Untersuchungsmaterial. Die Autokorrelationsfunktion wird nun als Kombination der auf Diffusion (Formel 11) und Triplet-Übergang basierenden Funktionen beschrieben.

$$G(\tau)_{total} = G(\tau)_{Diff} \cdot X(\tau)_{Triplet} \quad \text{Formel 13}$$

Der Effekt des Tripletzustandes wird durch einen exponentiellen Abfall mit der Zeitkonstante τ_T und einem Anteil T modelliert. In gleicher Form können auch andere Phänomene, die ein zeitweises Verlöschen der Fluoreszenz (Blinking) bewirken, integriert werden.

$$X_{Triplet} = 1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} \quad \text{Formel 14}$$

Die normierte Autokorrelationsfunktion hat damit die Form:

$$G(\tau) = \frac{1 + \frac{T}{1-T} e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{N} \left(\sum_1^n \frac{m_k}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,k}}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{D,k}}}} \right) + 1 \quad \text{Formel 15}$$

Besitzen die Komponenten k eine verschiedene molekulare Helligkeit, was z.B. durch Bindungsereignisse hervorgerufen werden kann, ist dieses durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors α zu berücksichtigen (Formel 16), der das Verhältnis der molekularen Helligkeiten angibt.⁶⁹ Unterschiedlichen Diffusionszeiten wird durch Einstellung der Komponentenanzahl der Fitroutine Rechnung getragen. Das entsprechende Programm des ConfoCor 2 erlaubt die Anpassung des Tripletanteils sowie dreier Komponenten von gleicher molekularer Helligkeit unter Verwendung von Formel 15.

$$Y_{corr} = \frac{Y_{FCS}}{Y_{FCS} + \alpha^2 (1 - Y_{FCS})} \quad \text{Formel 16}$$

2.1.4 Signal-Rausch-Verhältnis

Die Korrelationsfunktion ist wie jedes experimentelle Ergebnis mit einem Rauschen behaftet. Die Ursachen dafür liegen in dem Detektionsprozess (shot noise), sowie in den statistischen Veränderungen des detektierten Signals, die die Basis der Analyse darstellen. Unter Einbeziehung einiger Näherungen wurde von Koppel eine Abschätzung des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N) vorgenommen.⁷⁰ Dabei wird angenommen, dass die Anzahl an Fluorophoren im effektiven Volumen groß ist ($N \gg 1$). Weiterhin soll ein Messintervall ΔT kurz gegenüber der charakteristischen Diffusionszeit τ_D sein. Dieses Messintervall stellt die

Breite eines Kanals des Korrelators dar. Zudem wird die Korrelationsfunktion durch einen exponentiellen Abfall und nicht durch die in Formel 15 beschriebene Form dargestellt. Damit erhält man folgenden Zusammenhang:

$$\frac{S}{N} \propto \frac{\sqrt{M} \cdot \eta \Delta T}{\sqrt{1 + 4\eta \Delta T + 2(\eta \Delta T)^2 \cdot \left(\tau_D / \Delta T\right)}} \quad \text{Formel 17}$$

Hier ist M die gesamte Messdauer und $\eta \Delta T$ stellt die pro Messintervall detektierte Photonenzahl dar. Zur Beurteilung des Signal-Rausch-Verhältnisses können zwei Fälle unterschieden werden.

$$\eta \Delta T \ll 1 \quad \frac{S}{N} \propto \sqrt{M} \cdot \eta \Delta T \quad \text{Formel 18}$$

$$\eta \Delta T \gg 1 \quad \frac{S}{N} \propto \sqrt{M \cdot \frac{\Delta T}{\tau_D}} \quad \text{Formel 19}$$

Demnach steigt das Signal-Rausch-Verhältnis linear mit der molekularen Helligkeit η , solange gilt $\eta \Delta T \ll 1$. Darüber hinaus ist das Signal-Rausch-Verhältnis unabhängig von der molekularen Helligkeit und kann nur durch Verlängerung der Messdauer M erhöht werden. Die Abhängigkeit von der Wurzel der Messdauer ist ein üblicher Zusammenhang, der auch in anderen Methoden auftritt.

Die molekulare Helligkeit kann durch die Wahl eines geeigneten Farbstoffs sowie eine hohe Anregungsintensität gesteigert werden. Letzteres ist jedoch nur begrenzt möglich, da auch der Anteil der Fluorophore im Triplettzustand ansteigt. Weiterhin ist die Streuung durch das Lösungsmittel a linear von der Anregungsintensität abhängig, so dass das Hintergrundsignal zunimmt.

Während bei einer Teilchenanzahl $N \geq 1$ das Signal-Rausch-Verhältnis nicht, wie in makroskopischen Systemen, durch eine Steigerung der Konzentration zu erreichen ist, gilt für $N \ll 1$ folgender Zusammenhang.

$$\frac{S}{N} \propto \sqrt{N} \quad \text{Formel 20}$$

Neben hohen Transmissionswerten der optischen Komponenten ist die Wahl der Filter von großer Bedeutung für die molekulare Helligkeit eines Farbstoffs. Bandpassfilter reduzieren den detektierten Hintergrund aufgrund von Ramanstreuung, grenzen aber auch den Anteil der Fluoreszenzemission ein. Dagegen erlauben Longpassfilter die Detektion eines großen Teils der emittierten Fluoreszenzstrahlung sowie des inelastisch gestreuten Anregungsstrahlung.

2.1.5 Diffusion

Die Moleküle einer Flüssigkeit sind aufgrund ihrer thermischen Energie in ständiger ungerichteter Bewegung (Brownsche Molekularbewegung). Ihr Impuls kann durch Stöße auf größere Moleküle wie z.B. Proteine übertragen werden, deren Gesamtimpuls statistisch verteilt ist. Ein System im Ungleichgewicht, wie es beispielsweise durch einen Konzentrationsgradienten hervorgerufen wird, strebt zeitabhängig dem Gleichgewicht zu. Im Fall eines Stofftransports wird dieser Vorgang als Diffusion bezeichnet. Die zugrundeliegenden thermodynamischen Größen wie der Diffusionskoeffizient und die Viskosität sind in makroskopischen Systemen nur im Ungleichgewichtszustand messbar, was allgemein zur Entwicklung von Relaxationsverfahren geführt hat. Auf mikroskopischer Ebene sind Informationen auch in einem dynamischen Gleichgewicht zu erhalten, da hier das Messsignal nicht eine Mittelung der statistisch verteilten Größen darstellt. Daraus resultiert die Bezeichnung Diffusionszeit für die durch FCS gewonnenen Daten, auch wenn diese in Abwesenheit eines Konzentrationsgradienten ermittelt werden.

Die Geschwindigkeit eines Moleküls in einer flüssigen Phase ist seinem Diffusionskoeffizienten D proportional, welcher nach der Stokes-Einstein-Gleichung durch den hydrodynamischen Radius a und die Viskosität des Mediums η gegeben ist:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad \text{Formel 21}$$

Der hydrodynamische Radius a eines globulären Moleküls kann durch Formel 22 angenähert werden, wobei die Masse eines Moleküls, gegeben durch den Quotienten der Molaren Masse m und der Avogadrokonstante N_A , ins Verhältnis zur Dichte des Moleküls ρ gesetzt wird. Abweichungen von der globulären Form führen zu einem größeren hydrodynamischen Radius. Viele lösliche Proteine lassen sich so beschreiben, wobei deren Dichte im Mittel mit 1,2 g/ml angenommen werden kann.⁷¹

$$a = \sqrt[3]{\frac{3m/N_A}{4\pi\rho}} \quad \text{Formel 22}$$

Die zeitliche Änderung der Konzentration durch Diffusion wird durch das zweite Ficksche Gesetz beschrieben. Demzufolge ist die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung der Steilheit des Konzentrationsgradienten proportional.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad \text{Formel 23}$$

Die Lösung der Differenzialgleichung für eine freie Diffusion in allen Raumrichtungen entspricht einer radialsymmetrischen Gaußverteilung $c(r)$. Betrachtet man eine eindimensionale Diffusion von n_0 Teilchen entlang der x -Achse ausgehend von einer Fläche A in der y,z -Ebene, erhält man:

$$c(x) = \frac{n_0}{A(\pi Dt)^{\frac{1}{2}}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad \text{Formel 24}$$

Während Formel 24 für ein makroskopisches System entwickelt wurde, kann die eindimensionale Bewegung eines einzelnen Moleküls durch eine große Anzahl von Sprüngen simuliert werden. Legt es während der Zeit τ die Schrittweite λ zurück, ist die Wahrscheinlichkeit, es nach der Zeit t an dem Punkt x zu finden:

$$P(x) = \sqrt{\frac{2\tau}{\pi t}} \cdot e^{-\frac{x^2}{2t\lambda^2}} \quad \text{Formel 25}$$

Aus einem Vergleich mit Formel 24 folgt die Einstein-Smoluchowski-Gleichung, die den Diffusionskoeffizienten durch die Schrittweite und die Frequenz der Sprünge darstellt. Damit wird eine Verbindung der mikroskopischen Moleküleigenschaften und makroskopischen Größen geschaffen.

$$D = \frac{\lambda^2}{2\tau} \quad \text{Formel 26}$$

Mikroskopie im Nanometer-Bereich

Für die zuvor beschriebenen optischen Mikroskope gilt eine Begrenzung der möglichen lateralen Auflösung d_{min} , die aufgrund von Beugungsphänomenen von der Wellenlänge des Lichts λ und der Numerischen Apertur NA abhängt.

$$d_{min} = \frac{1,22\lambda}{2NA} \quad \text{Formel 27}$$

Für sichtbares Licht beträgt diese Grenze etwa 250 nm. Durch die Einführung innovativer Techniken wie STED konnte diese Begrenzung umgangen werden.⁷² Eine andere Herangehensweise besteht in der Verringerung der Wellenlänge der eingesetzten elektromagnetischen Strahlung, was zur Entwicklung der Elektronenmikroskopie (EM) geführt hat.⁷³ Neben der Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung lassen sich auch andere Interaktionen zur Abbildung von Proben einsetzen, womit die Beugungseffekte prinzipiell vermieden werden können. Hier spielen Rastersondenmikroskope (engl. Scanning Probe Microscope, SPM) eine wichtige Rolle, die Oberflächen gewissermaßen „abtasten“ und je nach Aufbau des Gerätes verschiedene Charakteristika der Probe analysieren. Unter geeigneten Bedingungen können EM und SPM atomare Auflösungen erreichen. Daher stellen sie geeignete Techniken zur Untersuchung von nanoskaligen Materialien dar.

2.2 AFM

Die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscope, AFM) gehört zu der Gruppe der Rastersondenverfahren, wobei die Oberfläche einer Probe von einer feinen Spitze gescannt wird, die idealerweise atomare Dimensionen besitzt. Das AFM wurde 1986 basierend auf dem Rastertunnelmikroskop (Scanning Tunneling Microscope, STM) entwickelt⁷⁴ und erlaubt im Gegensatz zu diesem auch die Abbildung von Proben, die keine elektrische Leitfähigkeit aufweisen. Das macht diese Technik für eine breite Anwendung in der Oberflächenphysik und den Nanowissenschaften relevant. Darüber hinaus ist auch der Einsatz in flüssigen, insbesondere wässrigen Medien möglich, wodurch sich biologische Proben und sogar lebende Zellen unter weitgehend nativen Bedingungen untersuchen lassen.

Bei einem AFM befindet sich die Sonde am freien Ende eines Hebelbalkens (Cantilever), dessen Auslenkung proportional der Kraft zwischen der Spitze und der Probe ist (Abb. 12). Als Sonde wird in der Regel eine Spitze aus Silizium oder Siliziumnitrid verwendet, die einen Krümmungsradius von wenigen nm aufweist. Die hier auftretenden Kräfte liegen im Bereich von einigen pN bis zu μN und werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Die Messung der Auslenkung des Cantilevers erfolgt meist über einen optischen Hebel, wobei ein Laserstrahl von dem Cantilever auf einen positionssensitiven Quadrantenphotodetektor reflektiert wird. Dessen Daten werden von der Steuerungselektronik verwendet, um die vertikale Position des Cantilevers über der Probe zu regulieren. Kombiniert mit der lateralen Scanbewegung wird so ein dreidimensionales Profil der Probe erhalten. Für die Positionierung kommen Piezoaktuatoren zur Verwendung, die eine hochpräzise Bewegung ermöglichen, so dass sich Auflösungen im Subnanometerbereich realisieren lassen. Darüber hinaus sind durch Modifikationen des Messaufbaus auch Daten beispielsweise hinsichtlich des Oberflächenpotentials (Kelvin Probe Microscope, KPM) sowie der magnetischen (Magnetic Force Microscope, MFM) oder der thermischen Zustände (Scanning Thermal Microscope, SThM) der Probe messbar.⁷⁵

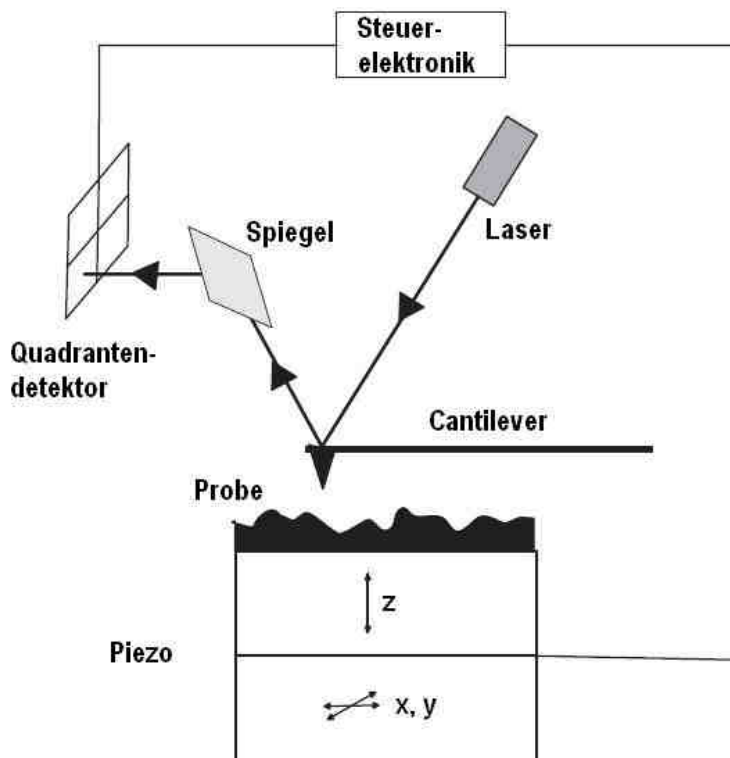


Abb. 12 Schematischer Aufbau eines AFM. Alternativ zum dargestellten Probenscanner kann auch die Spitze bewegt werden (Tipscanner).

Verwandte Techniken der SPM-Familie basieren beispielsweise auf dem Tunnelstrom zwischen Spitze und Probe (STM). Andere Techniken nutzen optische Signale (Scanning Near Field Optical Microscopy, SNOM) oder den Ionenfluss in einer wässrigen Salzlösung (Scanning Ion Conductance Microscopy, SICM).

Neben der Abbildung einer Probenoberfläche (Rasterkraftmikroskopie) lassen sich die zwischen der Probenoberfläche und der Sonde wirkenden Kräfte und ihre Abstandsabhängigkeit quantifizieren. Die Funktionalisierung der Oberfläche der Spitze und / oder der Probe erweitert diese Technik dahingehend, dass auch Messungen der Wechselwirkungen und Bindungskräfte zwischen einzelnen Molekülen möglich werden (Rasterkraftspektroskopie).

2.2.1 Intermolekulare Kräfte

Zwischen der AFM-Sonde und der Probenoberfläche wirken verschiedene Kräfte, die eine charakteristische Abstandsabhängigkeit aufweisen. Diese kann in gewissen Grenzen durch die Umgebungs- beziehungsweise Messbedingungen beeinflusst werden. Attraktive Wechselwirkungen treten zwischen permanenten und / oder induzierten Dipolen (Van-der-Waals-WW) auf, wenn sich die Spitze und die Probe annähern. Wegen der $1/r^6$ -Abstandsabhängigkeit^h verfügen diese Kräfte über eine relativ kurze Reichweite, innerhalb derer sie jedoch einen signifikanten Effekt auf die Messungen ausüben. Die polaren SiO₂ Gruppen, die sich an der Oberfläche von AFM-Spitzen aus Silizium sowie auch aus Siliziumnitrid vorfinden, stellen permanente Dipole dar und können verstärkt zu induzierten Dipolen an der Probenoberfläche führen. In wässrigen Medien entstehen durch Hydrolyse Silanolgruppen (Si-O-H), die abhängig von dem pH-Wert des Mediums dissoziieren und so eine elektrisch negativ geladene Oberfläche generieren. Unter stark sauren Bedingungen ist auch eine Protonierung möglich, die zu einer positiven Ladung führt. Abhängig von der Probenoberfläche können so elektrostatische Wechselwirkungen auftreten, die beispielsweise zwischen einer Siliziumnitrid-Spitze und Glimmer 0,13 nN betragen und über eine Distanz von ca. 40 nm abfallen.⁷⁶ Hier spielen im Medium gelöste Ionen eine entscheidende Rolle, da sie diese statischen Wechselwirkungen abzuschirmen in der Lage sind, während rasch fluktuierende induzierte Dispersions-WW weniger betroffen sind und so eine attraktive WW erhalten bleibt. In biologisch relevanten Puffern und Kulturmedien beträgt die Ionenstärke ca. 150 mM, wodurch elektrostatische WW weitgehend unterdrückt werden.⁷⁶ Bei einer weiteren Annäherung zwischen der Spitze und der Probenoberfläche kommt es aufgrund des von Pauli formulierten Verbots eines Überlappens der jeweiligen besetzten Atomorbitale zu einer starken repulsiven WW. Das Lennard-Jones-(12,6)-Potential beschreibt repulsive und attraktive WW durch Terme der 12. beziehungsweise der 6. Potenz des Abstandes r . Bei r_0 beträgt das Potential 0, das Minimum ϵ wird bei $2^{1/6} r_0$ erreicht:

$$V = 4\epsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right]$$

Formel 28

^h Für zwei induzierte Dipole (Dispersionswechselwirkung).

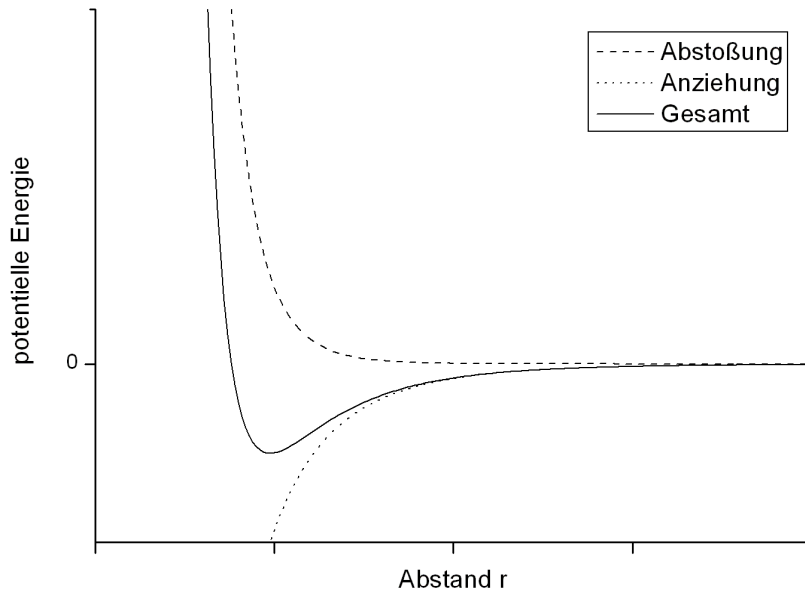


Abb. 13 Das Lennard-Jones-(12,6)-Potential beschreibt die potentielle Energie als Funktion des Abstandes durch attraktive und repulsive Wechselwirkungen

Dieselben Aussagen gelten prinzipiell auch für die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln, wo sie für deren Dispergierbarkeit beziehungsweise Agglomeration in Fluiden verantwortlich sind (vgl. Kap. 1.2.4). Für die praktische Funktion eines AFM resultieren somit zwei Regime, in denen das Gerät arbeiten kann: In einer Entfernung von einigen Nanometern von der Probe (Nahfeld) dominieren attraktive Kräfte die Wechselwirkung, während bei weiterer Annäherung repulsive Kräfte vorherrschen. Darauf gründen sich die verschiedenen Abbildungsmodi wie Contact Mode (repulsiv) und die dynamischen Modi des Non-Contact Mode (attraktiv) sowie Intermittend Contact Mode (repulsive wie auch attraktive WW sind vorhanden). Diese werden im Anschluss an die Erläuterung der Kraftmessung beschrieben.

2.2.2 Kraftmessung und Kraftspektroskopie

Die Abbildung der Probenoberfläche basiert auf den genannten Kräften, die zwischen der Probe und der Sonde wirken und durch die Kontrollelektronik in Bilddaten sowie Steuersignale umgesetzt werden. Darüber hinaus können die Kräfte direkt gemessen und beispielsweise auch hinsichtlich von Bindungs- oder Adhäsionsereignissen ausgewertet werden. Die hierzu relevanten Grundlagen sollen nun beschrieben werden.

Die zwischen der Probe und der AFM-Sonde wirkenden Kräfte führen zu einer Verbiegung (engl. Deflection) des Cantilevers aus seiner Ruheposition. Für kleine vertikale Auslenkungen Δz gilt für die Kraft F das Hook'sche Gesetz:

$$F = k \cdot \Delta z \quad \text{Formel 29}$$

Die Federkonstante k eines balkenförmigen Cantilevers wird durch seine Dimensionen (Länge l , Breite b und Höhe h) und Materialeigenschaften (Elastizitätsmodul E) gegeben:

$$k = \frac{3EI}{l^3} = \frac{3Eb^3}{l^3} \quad \text{Formel 30}$$

Auf diesen Daten basieren die von Herstellern angegebenen typischen Werte der Cantilever, die jedoch innerhalb einer Charge schwanken können und daher für jeden Cantilever vor der Messung individuell bestimmt werden (Kap. 2.2.3). Dadurch wird die während der Abbildung vertikal auf die Probe ausgeübte Kraft bestimmbar, die gerade bei empfindlichen Proben wie biologischen Zellen zu Veränderungen und Beschädigungen führen kann und im Contact Mode unter 100 pN liegen sollte.⁷⁷ Die eigentliche Bedeutung liegt allerdings im Bereich der Kraftspektroskopie, bei der das AFM meist zur Bestimmung von Bindungskräften zwischen an der Spitze und der Probenoberfläche immobilisierten Molekülen genutzt wird. Dazu werden Kraft-Distanz-Kurven aufgezeichnet, wobei die Spitze meist häufig wiederholt Annäherungs- und Entfernungszyklen durchfährt. Man kann dabei folgende Ereignisse unterscheiden:

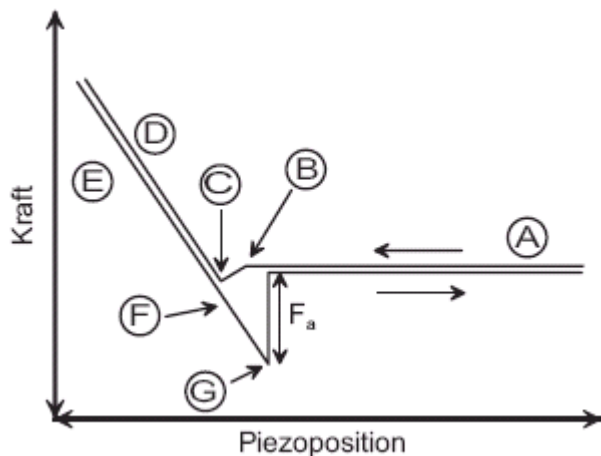


Abb. 14 Typische Bereiche einer Kraft-Distanz-Kurve

In weiter Entfernung von der Probe wirken keine Kräfte zwischen der Sonde und der Probe (A). Verringert sich der Abstand, kommt es zu einer meist attraktiven Wechselwirkung (B), falls abstoßende elektrostatische WW dominieren, ist auch eine netto repulsive WW möglich. Ab dem Punkt (C) hat die Spitze Kontakt zur Probenoberfläche, so dass bei weiterer Annäherung repulsive Kräfte dominieren (D). Diese sind auch während der Rückzugsbewegung bestimmend, die idealerweise den gleichen Kurvenverlauf aufweist (E). Aufgrund attraktiver WW bleibt der Kontakt zwischen der Spitze und der Probe weiterhin bestehen, auch wenn diese weiter von der Oberfläche entfernt wird (F). Der Cantilever übt nun eine kontinuierlich ansteigende und von der Probe weg gerichtete Kraft aus, die den Cantilever in die Ruheposition zurückschnellen lässt, wenn ihr Betrag dem der attraktiven Kraft F_a entspricht (G). Sollen mittels Kraftspektroskopie die Bindungskräfte zwischen zwei Molekülen wie beispielweise Ligand-Rezeptor-WW untersucht werden, können diese über Linkermoleküle an der Spitze und der Probenoberfläche immobilisiert werden. In diesem Fall erhält man einen zweiten Peak der Kraft, der auf der horizontalen Achse um die Länge des Linkers versetzt auftritt und dessen Amplitude entsprechend die Bindungskraft charakterisiert. An der Luft bildet sich besonders an hydrophilen Oberflächen ein dünner Wasserfilm aus, der sich beim Kontakt zwischen der Spitze und der Probe vereinigt. Aufgrund der Oberflächenspannung entstehen signifikante Meniskuskräfte, die die Messungen stören, so dass in der Regel in Flüssigkeit (meist Wasser), im Vakuum oder unter einer Atmosphäre trockener Gase gearbeitet wird.

Um die Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern (beispielweise Proteinen) zu untersuchen, werden diese aufgereinigt und unter definierten Bedingungen an der Spitze und der Probenoberfläche immobilisiert untersucht. Eine andere Anwendung erschließt sich durch die Kombination der Kraftspektroskopie mit dem lateralen Scanning der Probe durch das AFM. Fährt man ein Gitter von Messpunkten ab, erhält man eine zweidimensionale Karte der

Affinität einer Oberfläche zu dem Bindungspartner an der Spitze. Mit dieser als Force-Mapping bezeichneten Technik ist es damit auch möglich, eine Probenoberfläche nach unbekanntem Bindungspartnern abzusuchen und deren räumliche Verteilung zu ermitteln. Dieses Verfahren hat besondere Relevanz im Hinblick auf die Bindung von Nanopartikeln auf der Oberfläche von Zellen, da bislang kaum Informationen über Mechanismen der Bindung oder gar beteiligte Moleküle und potentielle Rezeptoren vorliegen.

2.2.3 Kalibration der Kraftmessung

Für die Kraftmessung mittels AFM spielt die Kenntnis der Federkonstante des Cantilevers eine essentielle Rolle, so dass verschiedene Methoden zu deren Bestimmung entwickelt wurden. Neben der bereits erwähnten Berechnung auf Basis der Dimensionen⁷⁸ sind folgende Alternativen zu nennen: Messen der Resonanzfrequenz bei zusätzlich angebrachter Masse,⁷⁹ Messen der Deformation des Cantilevers durch eine Eichfeder⁸⁰ und die Analyse des thermischen Rauschverhaltens des Cantilevers.⁸¹ Die letzte Technik ist berührungsfrei durchführbar und als Standard in kommerziellen Geräten implementiert. Daher ist sie in dieser Arbeit eingesetzt worden und soll nun genauer beschrieben werden.

Für kleine Schwingungsamplituden Δx des Cantilevers kann man ihn als einen harmonischen Oszillator auffassen, womit sich die Hamilton-Funktion ergibt:

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_0^2\Delta x^2 \quad \text{Formel 31}$$

Hier sind m die Masse, p der Impuls und ω_0 die Resonanzfrequenz des Cantilevers. Aufgrund des Äquipartitionstheorems gilt für den quadratischen Anteil

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega_0^2\Delta x^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad \text{Formel 32}$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante und T die Temperatur sind. Für die Federkonstante gilt $k = m\omega_0^2$ und damit

$$k = \frac{k_B T}{\langle \Delta x^2 \rangle} \quad \text{Formel 33}$$

Zur Bestimmung Fluktuation betrachtet man die spektrale Leistungsdichte, die in Abwesenheit anderer Rauschquellen ein Lorenzprofil aufweist, das durch die Amplitude Q_{amp} , die Güte w , die Peakfrequenz ν_c und den Hintergrundparameter Q_{bg} charakterisiert wird, wobei sich die Parameter durch einen Fit der experimentellen Daten erhalten lassen:

$$Q(\nu) = \frac{q}{\sqrt{\nu}} = Q_{bg} + \frac{Q_{amp} w^2}{w^2 + (\nu - \nu_c)^2} \quad \text{Formel 34}$$

Durch eine Integration erhält man die mittlere quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle = \langle \Delta x \rangle^2$, mit der man nach Formel 33 die Federkonstante bestimmt.

2.2.4 Abbildung und Abbildungsmodi

Zur Abbildung tastet die Spitze des Cantilevers die Probenoberfläche ab, wobei man zwei grundlegend verschiedene Modi unterscheiden kann. Im statischen Modus – auch Contact Mode genannt – befindet sich die Spitze konstant in Kontakt zur Probenoberfläche. Deren Profil wird durch die Auslenkung des Hebelarms erfasst. Ein Regelkreis steuert den vertikalen Abstand derart, dass ein voreingestellter Sollwert (Setpoint) der Auslenkung erhalten bleibt. Dieser ist direkt in eine auf die Probe ausgeübte vertikale Kraft umzurechnen (Formel 29). Durch die seitliche Scanbewegung kommt es auch zu lateralen Kräften und einer Reibung zwischen der Spitze und der Probe. Aus diesem Grund sind Messungen im Contact Mode vor allem für harte Proben geeignet beziehungsweise erfordern eine hinreichende Immobilisierung der Probe, was die Anwendung bei sensiblen biologischen Materialien einschränken kann. Als Informationen lassen sich aus der Messung das Höhenprofil sowie die vertikale und laterale Auslenkung (Deflection) in getrennten Kanälen erhalten.

Die zweite Abbildungstechnik wird als dynamischer Modus bezeichnet, bei dem der Cantilever zu einer Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt wird. Dicht über der Probenoberfläche erfährt er dabei unterschiedliche Kraftgradienten (Abb. 13), die die Schwingung hinsichtlich der Amplitude, der Phase und der Frequenz beeinflussen. Damit eignen sich diese drei Parameter – einzeln oder in Kombination – zur Regulation der Feedbacksteuerung. So ist es möglich, die Spitze berührungsfrei über die Oberfläche zu führen, was die Integrität sowohl der Spitze als auch der Probe erhält. Dieser Non-contact Mode arbeitet vollständig im attraktiven Bereich, erfordert jedoch eine kleine Schwingungsamplitude und besondere Bedingungen wie etwa ein Vakuum, um den häufig an Luft vorhandenen Wasserfilm auf den Oberflächen zu entfernen: Nach einem Kontakt mit diesem Film würde sich die Spitze aufgrund der starken Kapillarkräfte kaum mehr von der Probe lösen. Um diese und andere attraktive Kräfte überwinden zu können, wird bei Messungen an Luft oder in einer Flüssigkeit meist eine größere Schwingungsamplitude des Cantilevers verwendet (ca. 10 – 100 nm). In diesem als Tapping Mode bezeichneten Verfahren kommt es zu einer zeitweisen Berührung zwischen der Spitze und der Probe, die Oszillation durchläuft also attraktive und repulsive Bereiche. Das wird besonders anhand des Phasensignals deutlich, das für einen frei schwingenden Cantilever 90° beträgt, im attraktiven Regime auf Werte $> 90^\circ$ ansteigt und bei weiterer Annäherung schlagartig in den repulsiven Bereich $< 90^\circ$ wechselt (Abb. 15).ⁱ

ⁱ Einige AFM-Hersteller definieren in ihren Datenformat üblicherweise 90° als 0°

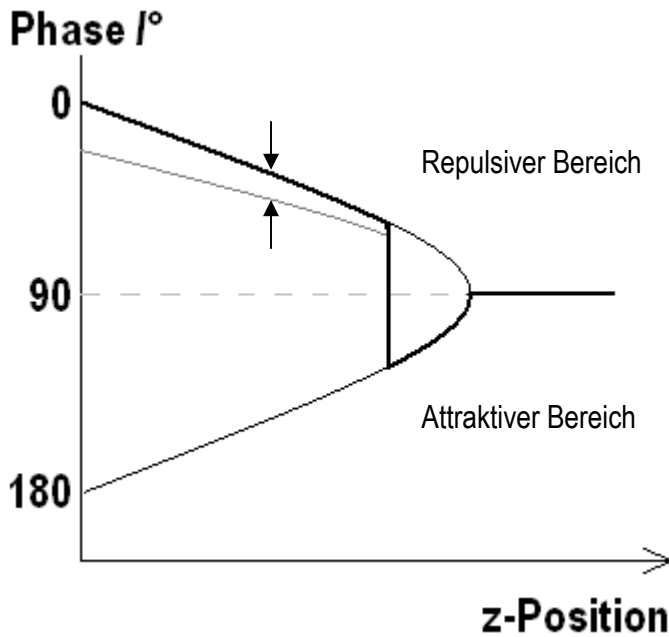


Abb. 15: Die Phasendifferenz des schwingenden Cantilevers in Abhängigkeit von der Distanz zu der Oberfläche durchläuft den attraktiven und repulsiven Bereich (fettgedruckt). Durch die Wechselwirkung mit der Probe im repulsiven Bereich kann ein Teil der Schwingungsenergie dissipieren (graue Kurve), was ebenfalls eine Phasendifferenz zur Folge hat (Pfeile).

Zur Regulation wird in hier die Amplitude der Oszillation herangezogen (Amplitude Modulation, AM), die durch die Annäherung der Spitze an die Probe sinkt. Da die Spitze die Oberfläche nur kurzzeitig berührt, kommen laterale Kräfte kaum zum Tragen, was für empfindliche Proben von Vorteil ist. Eine direkte Bestimmung der auf die Probe ausgeübten Kraft ist hier im Gegensatz zum Contact Mode nicht ohne Weiteres möglich, da sie von den drei genannten Parametern der Schwingung bestimmt wird, die im Tapping Mode voneinander abhängig und in der Regel nicht alle bekannt sind.⁷⁵ Jedoch lassen sich anhand der Phasenverschiebung φ zwischen der Anregung und der Oszillation des Cantilevers einige Informationen über die Wechselwirkung zwischen der Spitze und der Probe erhalten:⁸²

$$\sin(\varphi) = \frac{\omega}{\omega_0} \frac{A}{A_0} + \frac{QE_{dis}}{\pi k A A_0} \quad \text{Formel 35}$$

wobei ω und ω_0 die Anregungs- und Resonanzfrequenz, A und A_0 die gedämpfte und freie Amplitude, Q den Gütefaktor sowie k die Federkonstante darstellen. Nimmt man den ersten Term als konstant an (was für Oberflächen geringer Rauigkeit gelten kann), weist die unterschiedliche Dissipation der Energie E_{dis} des Cantilevers auf Heterogenitäten beispielweise der viskoelastischen Eigenschaften einer Probe hin.⁸³ Das ist in dieser Arbeit relevant für die Identifikation intrazellulärer Strukturen oder gegebenenfalls von Partikeln auf der Oberfläche von Zellen (Kap. 4.2.3). Durch entsprechende Wahl der Parameter (Anregungsfrequenz > Resonanzfrequenz, kleine Amplitude) kann der Cantilever auch vollständig im attraktiven Bereich gehalten werden, was an einem Phasensignal $> 90^\circ$ erkennbar ist. Beschädigungen der Probe können so weiter verringert werden, allerdings wird aufgrund des größeren Abstands zur Probenoberfläche die Auflösung des Tapping Mode nicht immer erreicht.

3 Material und Methoden

3.1 Bindung von GTP an Ms-Rac1

3.1.1 FCS-Aufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für FCS-Messungen das ConfoCor 2 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) eingesetzt. Es basiert auf dem inversen konfokalen Mikroskop Axiovert 200M, einem Lasermodul der Firma LASOS (Jena, Deutschland), das über drei Laser verfügt, einem Detektor mit zwei APDs sowie einer Steuerungseinheit. Das motorisierte Mikroskop wie auch die übrigen Komponenten sind über eine Regel- und Analysesoftware kontrollierbar.

In dem Lasermodul stehen drei Laser mit insgesamt 5 Wellenlängen bereit: 458, 488 und 514 nm (Argon-Ionen-Laser) sowie 543 und 633 nm (je ein Helium-Neon-Laser), was die Nutzung der meisten gängigen Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt. Zur Auswahl der Wellenlänge und Regulation der Intensität dient ein AOTF. Das Transmissionsverhalten dieses anisotropen Kristalls lässt sich durch Applikation von Schallwellen modulieren und ist vergleichbar mit einem Bandpassfilter. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde die 488 nm Emission des Argon-Ionen-Lasers genutzt, der bei 25 % der nominalen Leistung von 25 mW betrieben wurde. Zur genaueren Regelung der Leistung dient ein AOTF. An der Rückseite des Objektivs beträgt sie etwa 1,7 mW (100 % Transmission), für die jeweiligen Untersuchungen wurde die Transmission des AOTF auf 2 % entsprechend 0,034 mW reduziert.

Die Strahlung wird über ein Multimode-Glasfaserkabel zum Mikroskop geführt, dort durch einen Kollimator zu einem parallelen Strahlenbündel aufgeweitet und über einen Strahlteiler ins Objektiv (40x C-Apochromat, NA = 1,2) geleitet. Das von demselben Objektiv gesammelte längerwellige Fluoreszenzlicht passiert diesen Strahlteiler auf dem Rückweg und wird durch eine Optik auf ein Pinhole fokussiert, wobei Streulicht zuvor durch Filter abgefangen wird. Hinter dem Pinhole wird das Licht wieder in eine Glasfaser eingekoppelt und zu einem Detektor geleitet. Hierbei werden für lang- und kurzwelliges Fluoreszenzlicht jeweils verschiedene Kanäle verwendet, die über einen Spiegel anzusteuern sind. Zudem besteht die Möglichkeit einer Abbildung durch eine CCD-Kamera.

Es wird ein 40x C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,2 eingesetzt. Das effektive Volumen liegt damit unter 1 fl. Der Arbeitsabstand beträgt 220 μm und erlaubt Messungen in hinreichendem Abstand von der Probenoberfläche. Die Optik kann auf Glasdurchmesser von 140 – 180 μm korrigiert werden, was die Anwendung von Deckgläsern wie auch Mikrotiterplatten ermöglicht.

Die Detektoren sind in einem getrennten Gehäuse untergebracht, um eine Erwärmung der optischen Bauteile zu vermeiden. Es werden zwei APDs (SPCM-AQR-13-FC, PerkinElmer, Waltham, USA) mit einem niedrigen Hintergrundrauschen von < 250 Hz und einer Totzeit zwischen zwei Pulsen von 50 ns verwandt. Sie weisen eine wellenlängenabhängige Detektionseffizienz von 45 – 65 % auf. Die detektierten Photonereignisse werden über eine SCSI-Verbindung zu einem Computer übermittelt und dort in Echtzeit bezüglich der Auto- bzw. Kreuzkorrelation analysiert

Geräteeinstellung

Eine Bestimmung der Dicke D des Probenträgers erfolgt, indem die von der CCD-Kamera aufgenommenen Reflexionspunkte des Laserstrahls an den Glasoberflächen während der Annäherung des Objektivs vermessen werden. Aufgrund der motorgetriebenen Bewegung des Objektivs in axialer Richtung ist eine sehr präzise Positionsbestimmung möglich. Die so ermittelte scheinbare Dicke d wird wegen der Unterschiede der Brechungsindices n_i von Glas und Immersionsmittel (hier: Wasser) korrigiert:

$$D = \frac{n_{\text{Glas}}}{n_{\text{Wasser}}} \cdot d \quad \text{Formel 36}$$

Mit $n_{\text{Glas}} = 1,52$ und $n_{\text{Wasser}} = 1,33$ ergibt sich für die eingesetzten 18 x 18 mm Deckgläser der Firma Menzel (Braunschweig, Deutschland) $d = (124,5 \pm 3,1) \mu\text{m}$ und damit $D = 142,3 \mu\text{m}$. Der berechnete Wert wird am Korrekturring des Objektivs eingestellt und durch Messung der molekularen Helligkeit eines geeigneten Farbstoffs kontrolliert. Eine weitere Anpassung aufgrund von Abweichungen des Brechungsindex der Probe von dem reinen Wassers wurde anhand dieses Parameters durchgeführt.

Die Positionierung des Pinholes erfolgt automatisiert und ist auf eine maximale Zählrate des Detektors ausgerichtet. Dazu werden 20 μl einer 100 nM Rh6G-Lösung in H_2O auf ein Deckglas gegeben und das Objektiv 200 μm über die Glasoberfläche in den Tropfen fokussiert. Der Durchmesser des Pinholes wird für die Anregungswellenlängen 488 nm auf 70 μm eingestellt, so dass nur das Hauptmaximum der Beugungsscheibe abgebildet wird. Die Messungen von GTP-Atto bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurden unter Verwendung des Strahlteilers HFT 488 und des Emissionsfilters LP 505 durch geführt.

Zur Kalibrierung des Messvolumens nach Formel 1 und Formel 2 wird die Diffusionszeit eines Farbstoffs mit bekanntem Diffusionskoeffizienten (Rhodamin 6G: $D = 4.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)⁸⁴ gelöst in dem jeweiligen Messpuffer bestimmt. Der parallel für jede Wellenlänge ermittelte Strukturparameter S wird in der Analyse der folgenden Messungen als Konstante behandelt.

3.1.2 Messungen der GTP-Bindung an Ms-Rac1

Die Untersuchungen der Bindung von GTP-Atto (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) und Ms-Rac1 werden auf einem Deckglas durchgeführt. Dazu werden beide Lösungen im jeweiligen Messpuffer auf dem Deckglas zusammengegeben, so dass das Gesamtvolumen 10 μl beträgt. Um Konzentrationsänderungen durch Verdunstung zu unterbinden, wird der Tropfen in einer Messzelle platziert, die aus einem Gummiring (Innendurchmesser 5 mm) und einem aufgelegten Deckglas aufgebaut ist. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur (22 - 25 °C) durchgeführt, indem die ACF über jeweils 20 Sekunden bestimmt wird. Nach Blöcken von 10 Einzelmessungen^j erfolgt eine Pause von 40 Sekunden, die gesamte Messdauer beträgt bis zu einer Stunde.

^j Diese können auch zu einer entsprechend längeren Messung zusammengefasst analysiert werden, was sinnvoll sein kann wenn z.B. die molekulare Helligkeit des Farbstoffs geringer ausfällt, als bei dem hier verwendeten Atto488.

Die Konzentration des GTP-Atto wird aus den FCS-Daten bestimmt und beträgt 6 – 18 nM. Die Proteinkonzentration wurde durch die Bradford Methode mit BSA als Standard gemessen und in den Messvolumen im mikromolaren Bereich eingestellt. Wenn nicht anders vermerkt, wird ein HEPES-Puffer verwendet (25 mM HEPES, pH 7,5), der 1 mM DTT, 300 mM NaCl und 5 mM MgCl₂ enthält. Das Protein Ms-Rac1 wurde von Frau Martina Brecht aus der Gruppe von Prof. Kasten Niehaus (Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld) bereitgestellt. Die Synthese erfolgt rekombinant in E. coli. Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall wird zur Aufreinigung eine Affinitätschromatographie eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde dem Protein gentechnisch eine kurze Aminosäuresequenz (FLAG-Tag) angefügt, die von einem an der Chromatographiesäule immobilisierten Antikörper gebunden wird.¹⁷

Für die Auswertung wird ein Zwei- bzw. Dreikomponentenfit verwendet, der durch die mitgelieferte Software (V3.0 SP3) angepasst wird. Die so gewonnenen Daten werden mit Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) aufgearbeitet und hinsichtlich thermodynamischer und kinetischer Aspekte analysiert.

3.1.3 Chromatographische Analyse und Reinigung von GTP-Atto

Um die Präsenz von freiem Farbstoff zu testen und Isomere des mit Atto488 gelabelten GTP (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) zu trennen,^k kommt eine Dünnschichtchromatographie zum Einsatz. Hierzu wird ein Ionenaustauschermaterial auf Kieselgelbasis auf einer Aluminiumoberfläche verwendet, Alugram Sil G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Als mobile Phase dient eine Mischung aus 1-Propanol, Aceton, Eisessig, NH₃ 25 %, H₂O im Volumenverhältnis 38:24:14:14:10. Die Detektion der Fraktionen erfolgt unter Ausnutzung der Fluoreszenz des Atto488, welche durch eine Halogenlampe mit vorgeschaltetem GFP-Filter (Auflichtfluoreszenzeinheit Olympus IX81) angeregt wird. Als Emissionsfilter dient eine grüne Laserschutzbrille, so dass die einzelnen Fraktionen auf der getrockneten DC-Folie mit einem Bleistift markiert werden können. Das entsprechende Kieselgel wird abgekratzt und in Puffer suspendiert. Nach dem Abzentrifugieren des Gels erhält man im Überstand die getrennten Fraktionen, die mittels FCS anhand der unterschiedlichen Fluoreszenz- und Diffusionseigenschaften charakterisiert werden.

^k Der Farbstoff Atto488 ist über einen Ethylendiamin-Linker an das GTP gebunden, wobei entweder die 2'- oder die 3'-Position der Ribose als Anknüpfungspunkte dienen. Das Produkt GTP-Atto wird vom Hersteller als Gemisch beider Isomere vertrieben.

3.2 Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Zellen

3.2.1 Kultivierung der Zellen

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien untersucht:

Name	Zelltyp	Herkunft	Beschreibung	ATCC	Referenz
A549	Lungenepithel, Karzinom	Homo sapiens	human lung carcinoma established from an explanted lung tumor which was removed from a 58-year-old Caucasian man in 1972	CCL-185	^{85,86}
RLE-6TN	Alveolarepithel	Rattus norvegicus	Rat alveolar epithelial cells obtained by this method were transformed with the SV40-T antigen gene and two immortalized cell lines (RLE-6T and RLE-6TN) were obtained	CRL-2300	⁸⁷
NIH-3T3	Fibroblasten	Mus musculus	Embryonal	CRL-1658	⁸⁸
CaCo-2	Enddarmepithel Adenokarzinom	Homo sapiens		HTB-37	

Tabelle 1: Herkunft und Eigenschaften der untersuchte Zelltypen

Bei allen Zelllinien handelt es sich um adhären wachsende Zellen, deren Kultivierung auf der Bodenfläche (25cm²) von Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) bei 37 °C in einer mit 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre erfolgt (Revco Technologies, Asheville, NC). Der Gasaustausch geschieht über eine Membran in der Schraubkappe der Flaschen. Als Kulturmedien (Lonza, Basel, Schweiz) werden DMEM (A549, NIH-3T3), RPMI 1640 (RLE-6TN) und EMEM (CaCo-2) eingesetzt, die zusätzlich fetales Kälberserum (Art.-Nr. 15-151, PAA, Pasching, Österreich) enthalten (DMEM, RPMI jeweils 10 %, EMEM 20 %). Die Zellen wachsen innerhalb von etwa 3 – 4 Tagen zu einer ca. 90 % konfluenten (geschlossenen) Schicht und werden in diesem Stadium passagiert, d.h. in geringerer Zelldichte (1:10) wieder ausgesät. Hierzu werden sie mit PBS (Fluka, München, Deutschland) gewaschen und durch eine ca. zehnmütige Behandlung mit Trypsin und EDTA (Lonza, Basel, Schweiz) von der Unterlage abgelöst. Ein Teil des Volumens wird in eine neue Kulturflasche überführt. Die Zugabe von Medium erlaubt eine erneute Anheftung an die Gefäßoberfläche durch zweiwertige Kationen und stoppt die Wirkung von Trypsin durch den

in FCS enthaltenen Trypsininhibitor. Hierdurch können Adhäsionsproteine die Zelle auf der Oberfläche verankern und ein weiterer Abbau von Membranproteinen wird unterbunden. Alle eingesetzten Lösungen werden in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert, die Trypsinisierung findet bei 37 °C in einem Brutschrank statt. Nach 20 Passagen werden die Zellen verworfen und durch bei -70 °C gelagerte Kulturen ersetzt. Diese Proben wurden durch die Gruppe Dr. Schnekenburgers an der Universität Münster bereitgestellt.

Für die Untersuchungen der Zellen mittels AFM werden diese nicht in Kulturflaschen sondern in Petrischalen angezogen, die eine gute Zugangsmöglichkeit für das AFM erlauben. Für Messungen an chemisch fixierten Zellen sowie lebenden Zellen bei Raumtemperatur werden Kulturschalen (Ø 60 mm) aus Polystyrol (NUNC, Langenselbold, Deutschland) verwandt. Diese verfügen durch eine Oberflächenbehandlung über eine negative Oberflächenladung, wodurch die Anheftung der Zellen gefördert wird.

Untersuchungen lebender Zellen bei 37 °C werden in Willco-dish™ Kulturschalen (Ø 40 mm) mit einem dünnen Glasboden (Willco Wells, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt, die auf die Temperiereinheit des AFM („Dish-Heater“) abgestimmt sind.

Sollen getrocknete Zellen durch AFM oder SEM untersucht werden oder eine Inkubation mit Nanopartikeln in einem PDMS-Kanal durchgeführt werden, findet die Kultivierung auf Glasplättchen einer Kantenlänge von 8mm und 0,6 mm Stärke statt, die in Kulturschalen eingelegt inkubiert werden. Die Gläser werden zuvor durch eine jeweils fünfminütige Ultraschallbehandlung (Transsonic Digital S, Elma, Singen, Deutschland) in Aceton und Ethanol gereinigt, wobei so gleichzeitig eine Sterilisierung der Gläser erreicht wird.

Sind Zellen für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vorzubereiten, werden sie auf mit Kammern versehenen Objektträgern kultiviert (Lab-Tek™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Deren Glasboden hat eine auf Mikroskopobjektive abgestimmte Stärke von 170 µm.

Die Zellen sind je nach Zelldichte 1 – 2 Tage nach der Aussat bereit zur Untersuchung.

Sollen die Zellen mit einer Dispersion von Nanopartikeln inkubiert werden, welche mit Antibiotika versetzt ist, erfolgt auch die Kultivierung der Zellen in einem Medium, das je 100 mg/l Streptomycin und Ampicillin (Sigma Aldrich, München, Deutschland) enthält.

3.2.2 Präparation der Proben

Herstellen der Partikel-Dispersionen

Nanopartikel werden für diese Studie durch Rühren dispergiert, für methodologische Vergleiche kommt auch eine Ultraschallbehandlung der Probe zum Einsatz. Die Massenkonzentration der eingesetzten Dispersionen beträgt 0,01 – 1 mg/ml, wobei als Dispergierungsmittel deionisiertes Wasser, Pufferlösungen oder Kulturmedien mit oder ohne FCS-Zusatz dienen. Um Bakterienwachstum während der Präparation zu unterbinden, werden dem Kulturmedium Antibiotika beigesetzt (Streptomycin, Ampicillin je 100 mg/l). Für Probevolumina bis 6 ml werden die zu dispergierenden Nanopartikel in einem 10 ml Schnappdeckelglas eingewogen, mit dem entsprechenden Dispergierungsmittel überschichtet und auf einem Magnetrührer bei 900 U/min gerührt. Für größere Volumina von bis zu 50 ml kommt stattdessen ein abgedecktes 100 ml Becherglas zum Einsatz. Zur Inkubation auf

Zellen wird die Probe für 1d gerührt, für die Analyse der Partikelagglomeration auch für abweichende Zeiten.

Eine Ultraschallbehandlung der Dispersion wird gegebenenfalls nach ca. einminütigem Rühren für eine Dauer von 10 s bis 5 min bei 100 % der Leistung (Transsonic Digital S, Elma, Singen, Deutschland) durchgeführt.

Dispersionen von Fluospheres (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) werden durch Verdünnen der 2%igen Stammlösung in einer Konzentration von 0,1 – 1 mg/ml durch Rühren in FCS-haltigem Kulturmedium hergestellt. Aufgrund der Oberflächeneigenschaften dieser Partikel ist eine Agglomeration praktisch nicht zu beobachten, weshalb die Dispersionen nach einstündigem Rühren eingesetzt werden.

Bezeichnung	Durchmesser d ₅₀ / nm	Zeta-Potential bei pH 7/ mV	Hersteller	Bemerkungen
TiO ₂			ItN Nanovation	Stabilisator: Polyoxasäure
TiO ₂ (1.2)	27	-26	Evonik	
CeO ₂ (3.1)	14	44	Evonik	BET 63 m ² /g
CeO ₂ (3.2)	20	36	Evonik	BET 44 m ² /g
CeO ₂ (3.3)	23	37	Evonik	BET 38 m ² /g
CeO ₂ (3.4)	14	23	Evonik	BET 63 m ² /g
Böhmit II (5.2)	70		Bayer	
Hydroxylapatit			Sustech	Prismatische Nadeln, Charge 379

Tabelle 2: Untersuchte Nanopartikel, Herstellerangaben aus NanoCare-Abschlussbericht⁵⁰

Inkubation von Zellen mit Partikeln durch Sedimentation

Die Nanopartikel oder Fluospheres werden als Dispersion in Kontakt zu den zu untersuchenden Zellen gebracht und gelangen durch Sedimentation und auch Diffusion auf die am Boden der Kulturgefäße befindlichen Zellen. Zuvor werden die Zellen in der Kulturschale mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums sowie schwach gebundene Zellen zu entfernen. Anschließend werden die Zellen für 5 bis 120 min mit der Partikeldispersion inkubiert (wenn nicht anders angegeben 3 ml pro Kulturschale). Durch erneutes Waschen mit PBS entfernt man ungebundene Partikel. Dazu wird 1 ml PBS in die Kulturschale gegeben und mit einer Eppendorfpipette 5x langsam über den Boden der schräg gehaltenen Schale laufen lassen. Die Lösung wird verworfen und der Vorgang 2x wiederholt. Darauf fixiert man die Zellen. Alle Lösungen werden zuvor auf 37 °C gebracht, die Inkubation findet bei dieser Temperatur im Brutschrank statt.

Inkubation von Zellen mit Partikeln im Vorbeifließen

Bei dieser Methode wird die Partikeldispersion parallel zur Oberfläche an den Zellen vorbeigeführt. Die Fließrichtung ist vertikal nach oben ausgerichtet, so dass Partikel nicht durch Sedimentation auf die Zelloberfläche gelangen können. Dieses wird durch die Verwendung eines Kanals ermöglicht, der die mit Zellen bewachsenen Gläser (vgl. 3.2.1) aufnimmt. Dazu werden die Gläser in PBS bei 37 °C gewaschen und mit Pinzetten in die Vertiefungen eines Kanals aus Polydimethylsiloxan (PDMS) eingesetzt. Das die Partikeldispersion (50 ml) enthaltende Becherglas bringt man unter Rühren in einem Wasserbad auf 37 °C. Die Dispersion wird über einen Schlauch durch den Kanal geleitet, wobei mittels einer Schlauchklemme die Fließgeschwindigkeit regelbar ist, die hier auf etwa 3 ml/min eingestellt wird. Nachdem die Partikeldispersion durchgeflossen ist (ca. 15 min) werden die Zellen in gleicher Weise im Kanal mit 10 ml PBS bei 37 °C gewaschen und darauf in einer Petrischale fixiert.

Herstellung des PDMS-Kanals

Der Kanal wird aus 2 PDMS-Teilen zusammengesetzt, die übereinander gelegt und durch Klemmen fixiert werden. Der untere PDMS-Block verfügt über eine Reihe von 4 Vertiefungen im Abstand von je 5 mm, die die Gläser von 8 mm Kantenlänge aufnehmen. Der obere Teil bildet den eigentlichen Kanal, der durch eine langgestreckte Aussparung von 62 mm Länge, 12 mm Breite und 1mm Tiefe charakterisiert ist. An beiden kurzen Seiten sind Bohrungen von 2 mm Durchmesser angebracht, die Schläuche für Zu- und Abfluss aufnehmen. Die Dimensionen der PDMS-Blöcke sind Länge 90 mm, Breite 45 mm, Stärke 4 bzw. 5 mm für den unteren bzw. oberen Part. Sie werden durch Abformen entsprechender Glasteile in Petrischalen hergestellt, wobei die beiden Bestandteile des PDMS (Sylgard 184, Spoerle Electronic, Dreieich, Deutschland) ein Mischungsverhältnis von 10:1 zwischen dem Oligomer und dem Linker aufweisen. So lassen sich die für die Zellkultur eingesetzten 8x8 mm Glasplatten ohne weitere Halterungen und bündig abschließend mit der übrigen Oberfläche durch sanften Druck auf die Kanten der Gläser im Kanal verankern. Aufgrund der Stärke von 0,6 mm verfügen die Gläser über eine hierzu ausreichende Stabilität

Fixierung der Zellen

Die Fixierung der Zellen wird durch Vernetzen vor allem der Aminogruppen in Proteinen mittels Glutaraldehyd (auch Glutardialdehyd, GDA) und Formaldehyd durchgeführt. Die Reaktion findet in Petrischalen durch Zugabe der entsprechenden Lösungen statt.

Untersuchung der Zellen	Glutaraldehyd	Formaldehyd	Dauer /min
In Flüssigkeit	0,5 %	–	15 – 60
Dehydriert	4 %	4 %	45 – 60
	4 %	–	45 – 60

Tabelle 3: Fixierung der Zellen für AFM- und SEM-Untersuchungen

Anschließend werden die Proben 2x für je 10 min mit unter gelegentlichem Schwenken der Schale PBS gewaschen. Eine Lagerung der Zellen erfolgt in PBS oder KRP bei 4 °C. Ein Zusatz von 0,1 % Natriumazid verhindert das Wachstum von Mikroorganismen. Die Verdunstung des Puffers wird durch Umwickeln der Schalen mit Parafilm unterbunden.

Glutaraldehyd kann direkt durch Verdünnen der 25%igen Originallösung (Sigma Aldrich, München, Deutschland) mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden, Formaldehyd wird durch Depolymerisation aus Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, München, Deutschland) gewonnen. Diese geschieht durch Lösen des Feststoffes bei ca. 55 – 60 °C in Wasser, das durch Zugabe von Natriumhydroxid leicht alkalisch ist. Die klare Stammlösung wird durch Verdünnen in PBS auf die gewünschte Konzentration gebracht.

Die Methanolfixierung kommt gemäß dem Hersteller bei mit SYTO RNASelect gefärbten Zellen zum Einsatz. Die mit warmem PBS gewaschenen Proben werden mit auf -20 °C gekühltem Methanol bedeckt und 10 min bei -20 °C gelagert. Darauf erfolgen 2 Waschschrte mit PBS. Diese Fixierung kann vor oder nach der Färbung durchgeführt werden.

Osmiumtetroxid lagert sich an Kohlenstoffdoppelbindungen besonders der Membranlipide an und kann benachbarte Moleküle vernetzen. Das führt zu einer Fixierung der Membran, welche hinsichtlich der Trocknung in organischen Lösungsmitteln stabilisierend wirkt. Hierzu werden zwei Methoden angewandt:

Die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen werden in ein dicht verschließbares Glasgefäß gelegt, in dem sich festes Osmiumtetroxid befindet. Dieses sublimiert bei Raumtemperatur und gelangt in den die Zellen bedeckenden Tropfen PBS. Nach 15 – 60 min werden die Gläser 2x 20 min in einer Petrischale mit Wasser gespült.

Alternativ werden die Gläser mit einer Lösung von 1% Osmiumtetroxid in PBS bedeckt und in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre 45 – 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt der beschriebene Waschschrte in Wasser.

Alle Arbeiten mit Osmiumtetroxid finden aufgrund der Giftigkeit seiner Dämpfe unter einem Abzug statt.

Trocknung der Zellen

Zur Trocknung der Zellen wird das Wasser gegen ein organisches Lösungsmittel ausgetauscht, das eine kleinere Oberflächenspannung aufweist und damit während der Trocknung an Luft geringere Kräfte auf die Probe ausübt. Zuerst werden die Zellen einer kontinuierlich steigenden Ethanolkonzentration ausgesetzt. Dazu positioniert man die Gläser mit Wasser bedeckt in einer Petrischale in einem teilweise mit Ethanol gefüllten geschlossenen Gefäß (Becherglas Volumen 5L). Über 2 – 3 Tage findet ein Austausch von Wasser gegen Ethanol statt, durch Entfernen eines Teils des Wasser-Ethanol-Gemisches nach dem ersten Tag wird dieser Prozess beschleunigt. Anschließend wird der Ethanol durch Isopropanol ersetzt, indem die Gläser für jeweils 30 min in eine 1:1 Mischung Ethanol / Isopropanol und je 2x in Isopropanol inkubiert werden.

Eine Trocknung aus Isopropanol ist möglich, 2 weitere Lösungsmittel sind ebenfalls getestet worden: In der für Isopropanol beschriebenen Weise wird dieses durch Aceton oder Hexamethyldisilazan (HMDS) ersetzt.

Die Gläser werden in einer Kunststoff-Petrischale oder in einem Becherglas (da Aceton den Kunststoff angreift) bei leicht geöffnetem Deckel mehrere Stunden bei RT im Abzug gelagert,

wobei das Lösungsmittel langsam verdampft. Die Gläser werden in Petrischalen platziert, die in einem Exsikkator evakuiert, mit Argon befüllt und mit Parafilm verschlossen werden, wodurch die Zellen vor Luftfeuchtigkeit geschützt sind.

Beschichtung der Zellen mit einer Goldschicht

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wird auf die Proben durch Sputtern eine leitfähige Metallbeschichtung aufgebracht. Jeweils zwei der mit Zellen bewachsenen Gläser (8x8 mm) werden auf einem Probenträger aus Kupfer befestigt. Das geschieht durch Applikation von Leitsilberpaste an jeweils zwei Positionen am Rand der Gläser. Auf diese Weise erreicht man auch eine gute Kontaktierung zwischen der Goldschicht auf dem Glas und dem Probenträger. Der präparierte Probenträger wird durch Sputtern (MCS 010, Bal-Tec, Lichtenstein) mit einer Goldschicht von ca. 10 nm Dicke versehen. Hierzu evakuiert man die Kammer bis auf 2×10^{-5} mbar und befüllt sie darauf mit Argon bis zu einem Druck von 4×10^{-3} mbar, bei dem der Sputterprozess durchgeführt wird.

Färben der Zellen für Fluoreszenzmikroskopie

Zur Lokalisierung der an RNA reichen Nucleoli mittels 2PLSM wird die RNA der Zellen mit dem Farbstoff SYTO RNASelect (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Die in LabTek-Kammern kultivierten Zellen werden dazu mit PBS gewaschen, mit einer frisch zubereiteten 500 nM Farbstofflösung in PBS bedeckt und 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Darauf entfernt man die Lösung wäscht man die Zellen 3x mit PBS. Eine Methanol-Fixierung wird vor oder nach dieser Färbung durchgeführt. Bei der Färbung lebender Zellen sind alle Lösungen auf 37 °C anzuwärmen.

Die in LabTek-Kammern kultivierten Zellen werden mit PBS gewaschen und mit einer eisgekühlten Lösung von 5 µg/ml FM4-64FX in PBS für 1 min bei 0 °C inkubiert. Durch Platzieren der LabTek-Kammer auf einem gekühlten Metallblock wird ein guter Wärmeaustausch gewährleistet, wodurch eine Abschnürung endocytotischer Vesikel von der Cytoplasmamembran unterbunden wird und der Farbstoff allein in dieser Membran verbleibt. Da eine Variante des Farbstoffes verwendet wird, die über eine Aminogruppe verfügt, fixiert eine anschließende 10minütige Behandlung mit 4 % gekühltem Formaldehyd den Farbstoff in der Membran, was eine Untersuchung bei Raumtemperatur erlaubt. Darauf wird 3x mit PBS gewaschen.

3.2.3 AFM-Untersuchungen

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden an drei AFM-Geräten durchgeführt, wobei für den Hauptteil der Messungen das MFP-3D genutzt wurde:

Untersuchung	MFP-3D	BioScope	Multimode
Abbildung Nanopartikel in Trockenheit	X	X	X
Abbildung Zellen in Flüssigkeit	X	X	
Abbildung Zellen in Trockenheit	X	X	X
Kraftspektroskopie (FS)	X		

Tabelle 4: Verwendete AFM-Geräte und Einsatzzweck

Folgende AFM-Cantilever sind zum Einsatz gekommen:

Cantilever	Hersteller	k [N/m] ¹	f _{Luft} [kHz]	Einsatzbereich	
				Trockenheit	Flüssigkeit
BSTap 300 AI	BudgetSensors	40	300	AC	
PointProbe NCH	Nanoworld	42	330	AC	
NP-A	Veeco	0,58	57		AC / DC
NP-B		0,12	20		DC
NP-D		0,06	18		DC und FS
Biolever 1	Olympus	0,03	37		AC / DC
Biolever 2		0,006	13		DC

Tabelle 5: Verwendete Cantilever und Einsatzzweck.

Aufbau der Geräte

Während die generelle Funktionsweise eines AFM bereits beschrieben wurde, liegt das Augenmerk nun auf der Realisierung durch die Hersteller sowie den daraus folgenden Konsequenzen hinsichtlich der Handhabung und Eignung für die unterschiedlichen Anwendungsbereiche. Alle Geräte verfügen über einen Computer zur Steuerung der Messparameter und Auswertung der Daten sowie über einen entsprechenden Controller, der der Signalverarbeitung dient. Ein besonderer Schwerpunkt sei auf das MFP-3D-Bio gelegt, das im Rahmen dieser Arbeit angeschafft und für die meisten Untersuchungen eingesetzt wurde.

¹ Nominalwert des Herstellers. Bei kraftspektroskopischen Messungen für alle Cantilever, bei Abbildungen in Flüssigkeit stichprobenartig bestimmt.

Multimode

Das Nanoscope IIIa Multimode (Veeco, Santa Barbara, Kalifornien, USA) verfügt über verschiedene Tubescanner, die im open-loop-Modus betrieben werden. In dieser Arbeit wird ein J-Scanner mit einem Scanbereich von bis zu 115 μm und einem maximalen Z-Hub von 6,7 μm verwendet. Das die Probe tragende Glas oder Glimmer-Plättchen wird auf eine Nickelscheibe geklebt und magnetisch auf dem Scanner gehalten, der es unter der fest positionierten Spitze dreidimensional bewegt. Durch diesen Aufbau wird der laterale Durchmesser der Probenträger auf etwa 15 mm begrenzt. Der Z-Hub ist ausreichend für die Untersuchung der hier beschriebenen tierischen Zellen, die eine Höhe von bis zu 3 – 5 μm erreichen können. Eine Anpassung der Z-Position nach automatischer Annäherung kann jedoch erforderlich sein. Die Positionierung der AFM-Spitze in Relation zur Probe erfolgt unter Kontrolle durch eine über dem Aufbau befindliche Kamera. Die Messungen werden im Tapping-Mode an Luft durchgeführt.

BioScope

Das BioScope (Veeco, Santa Barbara, Kalifornien, USA) ist auf einem inversen Mikroskop Axiovert 100 (Zeiss, Jena, Deutschland) aufgebaut. Es arbeitet mit einem Tubescanner im open-loop-Modus, der die AFM-Spitze dreidimensional über die Probe führt und einen Scanbereich von 90 μm sowie einen Z-Hub von 6 μm aufweist. Die Probe befindet sich auf dem Objektisch des optischen Mikroskops wodurch bei transparenten Proben eine Positionierung des AFM unter lichtmikroskopischer Kontrolle möglich ist. Die Beleuchtung hierzu erfolgt mittels einer seitlich angebrachten Lampe, deren Licht über einen Spiegel am AFM-Kopf von oben auf die Probe gelenkt wird. Optische Kontrastverfahren (z.B. Phasenkontrast) sind in diesem Aufbau nicht realisiert. In Trockenheit werden Abbildungen im Tapping-Mode angefertigt, für Messungen in Flüssigkeit werden Tapping- und Contact-Mode eingesetzt.

MFP-3D

Für die Mehrzahl der Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden kam das MFP-3D (Asylum Research, Santa Barbara, Kalifornien, USA) zu Einsatz. Dieses AFM ist kombiniert mit dem inversen optischen Mikroskop IX71 (Olympus, Tokyo, Japan) und erlaubt in dieser Form eine räumliche und zeitliche Korrelation von rasterkraftmikroskopischen und lichtmikroskopischen Daten. Hierbei sind Fluoreszenz und Phasenkontrast nutzbar.

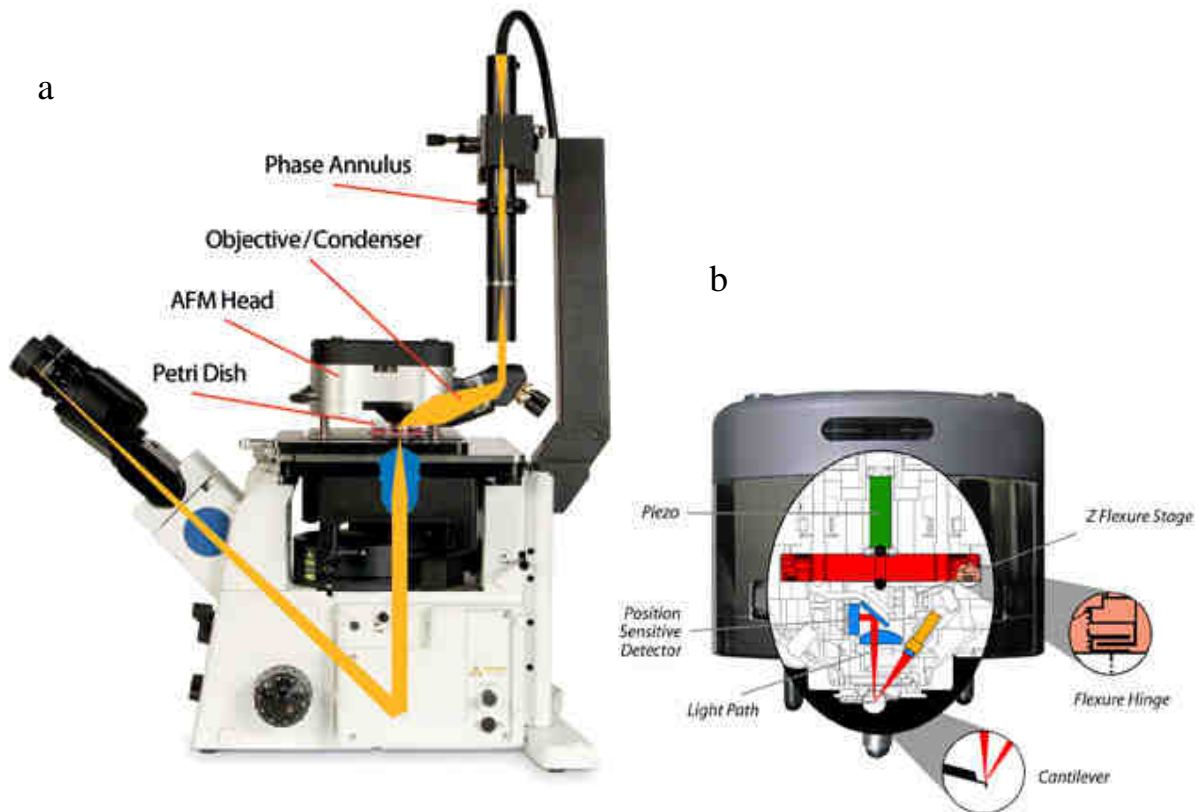


Abb. 16 Der Aufbau des MFP-3D mit eingezeichnetem Lichtweg für Phasenkontrastmikroskopie. Die Probe (Petrischale) ist auf dem flachen xy-Scanner fixiert (a). Der Aufbau des Messkopfs mit dem Lichtweg des Detektionslasers. Ein Piezostapel steuert die z-Position des Cantilevers (b). (Quelle Asylum Research)

Das AFM besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten, dem auf dem Mikroskopisch verankerten XY-Scanner sowie dem abnehmbaren Kopf. Die Bewegung in den drei Dimensionen wird getrennt voneinander durch Piezostapel realisiert. Die Probe wird lateral durch den XY-Scanner bewegt, wodurch eine horizontale Verschiebung erreicht wird, die im Gegensatz zu Messungen mit Röhreoscannern keine Krümmung aufweist. Die Z-Bewegung ist davon entkoppelt und findet im Kopf des AFM durch Kontrolle der Cantileverposition statt. Alle Piezos verfügen über eine Closed-loop-Regelung und ermöglichen einen Scanbereich von 90 μm sowie einen Z-Hub von 35 μm . Diese lange Distanz vereinfacht die Messung von Strukturen größerer Höhe wie den hier untersuchten Zellen.

Dieses AFM verwendet zum Auslesen der Cantileverbewegung eine Superlumineszente Diode einer Wellenlänge von 860 nm, womit Überschneidungen mit dem Spektrum von Fluoreszenzfarbstoffen vermieden werden.

Das gesamte Mikroskop steht zur Entkopplung von mechanischen Vibrationen auf einem aktiven Dämpfungstisch (TS300 LT, Herzan, Laguna Hills, CA), der in einer Schallschutzbox (in dieser Gruppe konstruiert) untergebracht ist, die gleichzeitig als Faradayscher Käfig fungiert. Zwei durch eine Schaumstoffschicht getrennte Marmorplatten bilden die Tischplatte, auf der der Aufbau platziert ist und sorgen wie auch der Laborplatz im Erdgeschoß für schwingungsarme Messbedingungen.

Das optische Mikroskop verfügt über ein 40x Objektiv (LUCPlan FLN-PH, Olympus, Tokyo, Japan) mit einer Numerischen Apertur von 0,60 und kann über einen Korrekturing hinsichtlich der Probenträgerdicke zwischen 0 und 2 mm eingestellt werden. Der Phasenkontrast dient der deutlichen Darstellung von Zellen in Flüssigkeit. Zur Fluoreszenzanregung im Epifluoreszenzmodus werden eine 50 W Quecksilberdampfampe

sowie ein FITC-Filtersatz genutzt. Eine CCD-Kamera gibt die Bilder an den Computer aus („Bottom-View“). Der Scanbereich des AFM wird so gewählt, dass er sich weitgehend mit diesem Videobild (90 x 120 µm) deckt und so eine Korrelation der Daten erlaubt. Über die Steuerungssoftware ist eine Auswahl und Ansteuerung des Scanbereichs des AFM auf Basis des Videobildes möglich.

In der Regel wird die zu untersuchende Probe bzw. die Petrischale auf einem gläsernen Objektträger platziert und dieser mit Magneten auf dem XY-Scanner befestigt. Eine zentrale Aussparung des Scanners gestattet die gleichzeitige Betrachtung einer transparenten Probe durch das Mikroskopobjektiv. Der Cantilever wird über einen entsprechenden Halter, der auch den Piezo für eine AC-Anregung beinhaltet am AFM-Kopf fixiert. Über eine oberhalb des Kopfes angebrachte Kamera („Top-View“) ist die Justage des Lasers auf dem Cantilever wie auch die der Spitze relativ zur Probe zu verfolgen. Die Annäherung der Spitze an die Probe erfolgt über die manuelle Absenkung des Kopfes, der über drei Beine auf dem Mikroskopisch positioniert ist. Bei Erreichen eines voreingestellten Setpoints (Amplitude oder Deflection) ertönt ein Signal und der Z-Piezo hebt die Spitze bei weiterer Absenkung des Kopfes entsprechend an.

Eine Kalibrierung des Cantilevers erfolgt auf Basis eines aufgenommenen thermischen Spektrums und der Auslenkung des Cantilevers bei Annäherung an eine harte Oberfläche.

In Abbildungen können mit dem AFM bis zu 5 Kanäle parallel mit Hin- und Rückspur aufgezeichnet werden. Die maximale axiale Anzahl an Bildpunkten beträgt 1536, in der Regel werden 512 aufgezeichnet. Als Scanrate werden abhängig von der Scangröße meist 0,5 - 2 Hz, teilweise auch deutlich niedrigere Werte, gewählt. Die Werte des Setpoints sowie des Gains werden anhand der Messdaten eingestellt und stellen einen möglichst geringen Druck der Spitze auf die jeweilige Probe sicher.

Der „Dish-Heater“ stellt ein Zusatzmodul dar, das im XY-Scanner eingebaut wird und eine Temperierung von Proben bis 45 °C ermöglicht. Der Heater verfügt über eine Heizfläche mit einer zentralen Aussparung zur lichtmikroskopischen Betrachtung sowie einen der Regelung dienenden Temperaturfühler. Die Probe wird in einer Petrischale mit dünnem Glasboden (Willco-dish™) auf die Heizfläche des Heaters gestestellt, wobei mit Immersionsöl eine wärmeleitende Kontaktierung erreicht wird. Ein auf dem oberen Rand der Schale angebrachter Ring fixiert diese über Magnete am Scanner. Eine flexible Gummidichtung am Kopf des AFM schließt die Schale ab, um eine Verdunstung des Mediums zu vermeiden. Dieser Aufbau wird für die kraftspektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und lebenden Zellen eingesetzt, wodurch die Zellen bei 37 °C gehalten werden.

Abbildungen von Nanopartikeln in Trockenheit

Als Probenträger wird Glimmer (Plano, Wetzlar, Deutschland) verwendet, dessen Oberfläche durch Abziehen mit einem Klebestreifen kurz zuvor gereinigt wird. Ein Tropfen von 0,5 - 5 µl der jeweiligen Partikeldispersion wird auf die Oberfläche pipettiert und an Luft getrocknet oder in einer H₂O-Atmosphäre für bis zu 30 min inkubiert. Verdunstet das Dispergierungsmittel rückstandsfrei (H₂O), wird die Probe direkt untersucht, eingetrocknete Bestandteile aus Puffern und Medien werden durch Spülen mit H₂O gelöst und entfernt.

Die Probe wird mit einem Haft-Aufkleber (Plano, Wetzlar, Deutschland) auf dem Probenträger fixiert (Nickelscheibe für Multimode, Glas-Objektträger für BioScope oder MFP-3D) und im Tapping-Mode an Luft untersucht.

Abbildungen von Zellen

Zur Untersuchung von Zellen in Flüssigkeit wird die Zellkulturschale an den Rändern mit Epoxidharz (Conrad, Hirschau, Deutschland) auf einen Objektträger geklebt, der auf dem Scanner (MFP-3D) oder Mikroskopisch (BioScope) fixiert wird. Ein Volumen von 4 ml Puffer oder Medium in der Schale erlaubt eine mehrstündige Messung ohne Flüssigkeit ergänzen zu müssen. Die Untersuchungen finden bei Raumtemperatur statt, zu Beginn wird der Cantilever ca. 30 min in der Flüssigkeit äquilibriert, um eine thermische Drift während der Messung weitgehend zu vermeiden. Eine Anpassung des Deflection-Setpoints während Abbildungen im Contact-Mode bleibt notwendig, um die auf die Probe ausgeübte Kraft konstant zu halten, insbesondere wenn die Messdauer über ca. 10 min beträgt. Bei Abbildungen im Tapping-Mode kann meist darauf verzichtet werden, da die Schwingungsamplitude im relevanten Bereich nur wenig von Änderungen des Deflectionwertes beeinflusst wird. Solche Veränderungen der Parameter werden (im Unterschied zu dem Multimode oder BioScope) bei Messungen mit dem MFP-3D automatisch protokolliert und können nachträglich mit den Messdaten korreliert werden.

Für Abbildungen in Trockenheit wird das die Zellen tragende Deckglas (8x8 mm) auf einem Nickelplättchen (Multimode) oder Objektträger (MFP-3D, BioScope) mit einem Haft-Aufkleber (Plano, Wetzlar, Deutschland) befestigt. Um dem Strahlengang des Lichtmikroskops nicht zu behindern, wird der zentrale Bereich des Aufklebers zuvor mit einem Skalpell entfernt so dass das Deckglas nur am Rand auf dem Objektträger fixiert wird.

Unter optischer Kontrolle wird der Scanbereich ausgewählt, wobei durch die Trocknung auch die Randbereiche der Zellen einen hinreichenden Kontrast aufweisen, so dass auf Verwendung des lichtmikroskopischen Phasenkontrasts verzichtet werden kann.

Zum Vermessen großer Scanbereiche (bis 60 μm) mit dem MFP-3D wird die Scangeschwindigkeit stark reduziert (bis 3 $\mu\text{m/s}$ entsprechend 0,02 Hz), wodurch bei einer hohen Anzahl an Bildpunkten (maximal 1536) die Dauer eines Scans bei bis zu 21 h liegt. Eine Überwachung der Messung und Anpassung der Parameter erfolgt dann mittels Remote Control von einem anderen Computerarbeitsplatz.

Kraftspektroskopie zwischen NP und Zellen

Der „Dish-Heater“ stellt ein Zusatzmodul dar, das im XY-Scanner eingebaut wird und eine Temperierung von Proben bis 45 °C ermöglicht. Der Heater verfügt über eine Heizfläche mit einer zentralen Aussparung zur lichtmikroskopischen Betrachtung sowie einen der Regelung dienenden Temperaturfühler. Die Probe wird in einer Petrischale mit dünnem Glasboden auf die Heizfläche des Heaters gestestellt, wobei mit Immersionsöl eine leitfähige Kontaktierung erreicht wird. Ein auf dem oberen Rand der Schale angebrachter Ring fixiert diese über Magnete am Scanner. Eine flexible Gummidichtung am Kopf des AFM schließt die Schale ab, um eine Verdunstung des Mediums zu vermeiden. Dieser Aufbau wird für die kraftspektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und lebenden Zellen eingesetzt, wobei diese bei 37 °C gehalten werden.

3.2.4 SEM-Untersuchungen

Die präparierten Zellen (Kap. 3.2.2) werden in einem SEM JSM-880 (Jeol, Tokyo, Japan) untersucht. Die Probe wird bei 4×10^{-3} mbar mit einem durch 15 oder 20 kV beschleunigten Elektronenstrahl von 5×10^{-11} bis 2×10^{-10} A gescannt. Bei Vergrößerungen von 1000 – 60000x werden Bilder von 480 x 640 bis zu 3000 x 4000 Pixel mit einer Integrationszeit von 100 μ s je Pixel aufgezeichnet.

3.3 Oberflächenstruktur von Bakterienzellen

3.3.1 Kultivierung der Bakterien

Es werden sowohl der Wild-Typ sowie zwei mutierte Stämme des Bakteriums *S. meliloti* untersucht.

<i>Sinorhizobium meliloti</i> Stamm	Beschreibung	Referenz
Rm2011	Wildtyp Stamm	⁸⁹
Rm0540	(exoY ⁻)	³⁶
Rm6963	(LPS defekt => verkürztes LPS)	⁹⁰

Tabelle 6: Charakteristika der untersuchten Bakterienstämme

Die Bakterien werden als Suspensionskultur bei 28 °C in Vincent Minimalmedium (VMM)⁹¹ herangezogen. Hierzu inkubiert man sie in Kunststoffröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) über Nacht bei 28 °C bis zu einer optischen Dichte von o.D.₅₈₀ ~ 0,6 – 0,8.

3.3.2 Präparation der Proben

Während die zuvor beschriebenen tierischen Zellen auf den betreffenden Oberflächen adhärent wachsen und entsprechend gehandhabt werden können, findet die Präparation der Bakterien teilweise in einer Suspension statt, woran sich die Immobilisierung auf einer geeigneten Oberfläche anschließt. Die hier beschriebene Vorgehensweise kommt in ihrer Gänze bei der Präparation für konventionelle SEM-Untersuchungen zum Einsatz, für Messungen mit dem Magellan-SEM und AFM wird sukzessive auf einzelne Schritte verzichtet. Die für die jeweilige Untersuchung spezifische Präparation wird dort beschrieben.

Für alle Untersuchungen werden die Bakterien zu Beginn in Eppendorfgefäßen zweimal mit PBS gewaschen, wobei man 1 ml Bakteriensuspension zur Abscheidung jeweils 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert (S417C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und das Sediment in jeweils 500 μ l neuem Puffer resuspendiert.

Fixierung

Wie schon für die tierischen Zellen beschrieben werden auch die Bakterien durch Vernetzen der Proteine mittels Glutaraldehyd und Paraformaldehyd in ihrer jeweiligen Form fixiert. Hierzu inkubiert man sie bei Raumtemperatur für 1h in einer jeweils 1,5 %igen Lösung in PBS, indem das abzentrifugierte Pellet in einer entsprechenden Lösung suspendiert wird.

Trocknung

Die fixierten Bakterien werden wie beschrieben gewaschen und in H₂O suspendiert. Ein Austausch des Wassers gegen Ethanol geschieht durch Platzieren der Proben in einer Ethanol-Atmosphäre für mindestens 48 h. Die Bakterien zentrifugiert man wieder ab (5 min 1500 rpm) und suspendiert sie in 500 µl Isopropanol. Ein Tropfen von 10 µl wird auf ein gereinigtes Deckglas pipettiert und dieses in einer Atmosphäre von Isopropanol über 48 h langsam getrocknet. Durch diesen Prozess haften die Bakterien ausreichend an der Glasoberfläche an.

Beschichtung mit Gold

Die Beschichtung der Bakterienproben erfolgt in gleicher Weise wie für die tierischen Zellen beschrieben (Kap. 3.2.2), wobei hier 12 nm Gold gesputtert werden.

3.3.3 AFM-Untersuchungen

Abbildungen in Flüssigkeit

Die Bakterien werden immobilisiert auf Objektträgern untersucht. Hierzu reinigt man die Gläser durch eine Ultraschallbehandlung von je 5 min in Aceton, Ethanol und Wasser. Auf den getrockneten Objektträgern wird eine Fläche von ca. 6 cm² mit Parafilm umrandet und dieser dort für wenige Sekunden bei 50 °C festgebacken. Durch dessen stark hydrophobe Eigenschaften kann ein relativ großes Probevolumen im umschlossenen Bereich gehalten werden. Mittels einer 30minütigen Inkubation mit 1 ml einer Lösung von 0,1 % Polyethylenimin (M_w 750000) in H₂O beschichtet man die umschlossene Oberfläche und erreicht eine positive Oberflächenladung. Es folgen ein ausgiebiger Waschschrift und die Trocknung mit Stickstoff. Auf den so präparierten Gläsern haften Bakterien über elektrostatische Wechselwirkungen ihrer negativ geladenen Zelloberflächen auch während der Untersuchung in wässrigem Medium.

1 ml der lebenden oder chemisch fixierten Bakterien wird jeweils nach Waschen in PBS auf die Glasoberfläche pipettiert und bei Raumtemperatur für 1 h in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Durch Spülen mit Wasser entfernt man schwach gebundene

Bakterien, die verbleibenden werden mit 400µl Medium, PBS oder Wasser bedeckt und darin mit dem AFM vermessen.

Für diese Untersuchungen kommt ausschließlich das AFM MFP-3D zum Einsatz. Es werden Microbiolever AC40TS (Olympus, Tokyo, Japan) im Tapping-Mode verwendet, die eine Federkonstante von 0,1 N/m besitzen und durch ihre geringe Länge eine relativ hohe Resonanzfrequenz von ca. 30 kHz in Wasser aufweisen. Sie verfügen über eine Siliziumspitze mit einem Krümmungsradius von 10 nm und verglichen mit in Flüssigkeit üblicherweise eingesetzten Cantilevern großen Aspektverhältnis (jeweils Herstellerangaben). Die Scangeschwindigkeit beträgt 2 – 4,5 µm/s.

Abbildungen in Trockenheit

Zur Abbildung werden die mit Bakterien bedeckten und getrockneten Deckgläser auf Nickelplättchen geklebt und mit einem Multimode gescannt. Zum Einsatz kommen BSTap300-A1 Silizium-Cantilever (Budget Sensors, Sofia, Bulgarien) im Tapping-Mode. Diese Cantilever sind charakterisiert durch eine Federkonstante von 40 N/m und eine Resonanzfrequenz von ca. 300 kHz. Die Spitze besitzt einen Krümmungsradius von < 10 nm (jeweils Herstellerangaben). Die Scangeschwindigkeit beträgt 1,8 – 10 µm/s.

3.3.4 SEM-Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Messungen kommt wie bei den Untersuchungen der tierischen Zellen (Kap. 3.2.4) das Jeol JSM-880 zum Einsatz. Die Beschleunigungsspannung beträgt hierbei 20 kV.

XHR SEM

Bei diesen Messungen wird das XHR SEM (extreme high resolution SEM) Magellan der Firma FEI (Hillsboro, Oregon, USA) eingesetzt. Die Präparation der Probe gleicht der für die beschriebenen SEM-Abbildungen, wobei hier keine Beschichtung der Proben mit Gold erfolgt. Als Beschleunigungsspannung werden 2 kV gewählt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Resultate der drei Themenbereiche dieser Arbeit dargestellt. Zu Beginn soll auf die Bindungsreaktion zwischen dem pflanzlichen Protein Ms-Rac1 und GTP eingegangen werden. Diese Reaktion findet frei in Lösung statt und wird durch FCS und AFM untersucht. Der zweite Teil befasst sich mit der Wechselwirkung zwischen tierischen Zellen und Nanopartikeln, wobei ebenfalls Bindungsreaktionen eine zentrale Rolle spielen. Diese sind hier an Oberflächen lokalisiert und werden durch AFM in Kombination mit Lichtmikroskopie sowie durch SEM analysiert. Im dritten Teil werden nun auch Oberflächeneigenschaften bakterieller Zellen durch hochaufgelöste Abbildungen charakterisiert. Die bewährten Untersuchungsverfahren AFM und SEM werden beibehalten und die Probe schließt einen Kreis zum ersten Themenbereich, da dieses Bakterium in dem dort beschriebenen biologischen Kontext Relevanz besitzt. Die Anwendungsmöglichkeiten der physikalischen Techniken AFM und SEM sowie der notwendigen biologischen Präparationsverfahren sind somit in einem weiten Spektrum an Proben evaluiert worden.

4.1 Bindung von GTP an Ms-Rac1

Lebende Systeme sind in der Lage, auf eine Vielzahl an äußeren Reizen zu reagieren. Dabei kommt es in der Zelle aufgrund eines Stimulus zu einer Kaskade von Signaltransduktionsprozessen, die die Information von Rezeptoren der Membran über das Cytoplasma bis zum Zellkern leiten. Die Kopplung verschiedener Signalwege erlaubt dabei eine differenzierte Reaktion, ohne jeweils ein vollständiger Satz individueller Moleküle zu benötigen. Hier wird eine komplexe Regulation erkennbar, die durch „Schalter“ gesteuert ist. Eine solche Funktion nimmt das hier untersuchte Protein Ms-Rac1 war, das in der Pflanze *Medicago sativa* als binärer Schalter fungiert. Verglichen mit tierischen Systemen ist bezüglich der Pflanzenwelt relativ wenig über Interaktionen dieser Klasse von Proteinen bekannt.⁷ Daher werden in dieser Arbeit nicht nur thermodynamische und kinetische Größen der GTP-Bindung bestimmt, sondern auch der Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die Wechselwirkung und das Protein selbst charakterisiert. Es ist zu klären, inwieweit von vergleichbaren tierischen Proteinen bekannte Eigenschaften übertragbar auf ein pflanzliches System sind. Aufgrund von Sequenzanalysen und dem darauf beruhenden strukturellen Modellierung sind Homologien zwischen Ms-Rac1 und humanem Hs-Rac2 aufgezeigt worden,^{3,17} die durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten experimentell unterstützt werden. Zum einen ist dieses von Interesse hinsichtlich eines evolutionsbiologischen Vergleichs verwandter Proteine aus dem Tier- und Pflanzenreich. Darüber hinaus eröffnen sich so Ansatzpunkte, gezielt Fragestellungen nach möglichen Wechselwirkungen in der pflanzlichen Signaltransduktion zu untersuchen, die in tierischen Systemen bereits besser aufgeklärt sind.

Neben Filterbindungsassays mit radioaktiv markierten Nucleotiden⁹² werden fluoreszenzbasierte Methoden für die Analyse der GTP-Bindung eingesetzt, wobei zumeist die Änderung der Fluoreszenzintensität geeigneter an GTP gekoppelter Farbstoffe infolge der Bindung gemessen wird.⁹³ Durch FCS ist zwar auch dieser Parameter zugänglich, die eigentlichen Ansatzpunkte der Methode sind aber hydrodynamische Eigenschaften der Moleküle. Auf diese Weise wurde es möglich, nicht allein die Bindung von GTP an Ms-Rac1 zu analysieren, sondern auch die Größe der beteiligten Moleküle zu bestimmen. Das ist von besonderer Bedeutung, da sich in dieser Arbeit herausgestellt hat, dass Ms-Rac1 in der Lage ist, abhängig von Umgebungsparametern Homo-Oligomere auszubilden. Dieser Prozess

wurde darüber mittels AFM untersucht, um die Aussagen mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen.

4.1.1 Photophysik des GTP-Atto

Um die Messbedingungen hinsichtlich der physikalischen Parameter zu optimieren, ist die Kenntnis der photophysikalischen Eigenschaften des eingesetzten Fluorophors von entscheidender Bedeutung. Die Fluoreszenzintensität bezogen auf ein einzelnes Farbstoffmolekül (molekulare Helligkeit, CpM) bestimmt das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung⁷⁰ und ist bei niedrigen Leistungsdichten des anregenden Laserstrahls linear von der Intensität des Lasers abhängig. Für höhere Leistungsdichten nimmt die Besetzung des Triplettzustandes zu, was dazu führt, dass weniger Moleküle zur Fluoreszenz beitragen. Darüber hinaus können in diesem angeregten Zustand chemische Reaktionen stattfinden, die zur Zerstörung des Farbstoffs führen.⁶⁴ Daher wurde die Laserleistung so gewählt, dass der Anteil der sich im Triplettzustand befindlichen Farbstoffmoleküle entsprechend den Empfehlungen des Geräteherstellers bei $\leq 20\%$ lag. Bei einer Laserleistung von 25 % der nominalen 25 mW und einer Transmission des AOTF von 100 % wurden an der rückwärtigen Apertur des Objektivs ca. 1,75 mW erreicht, bei der für FCS-Messungen eingestellten Transmission des AOTF von 2 % reduziert sich dieser Wert auf ca. 35 μ W. Bezogen auf den Fokus des Lasers in der Probe (Radius ca. 200 nm) beträgt die Leistungsdichte ca. 28 kW/cm². Der Einfluss der Laserleistung auf die Fluoreszenzeigenschaften wurde eingehend in meiner Diplomarbeit beschrieben.⁹⁴

Bei dem eingesetzten GTP-Atto handelt es sich um ein Gemisch zweier Isomere, da die Kopplung des Farbstoffs an das GTP sowohl über die 2' als auch über die 3'-OH-Gruppe der Ribose stattfindet. Da während der Untersuchungen deutlich wurde, dass der maximal erreichbare Bindungsgrad des GTP-Atto auch bei der größten Konzentration von Ms-Rac1 (ca. 40 μ M) mit ca. 40 % relativ gering war, wurde überprüft, ob die Isomere sich hinsichtlich der Bindung an Ms-Rac1 unterscheiden und ggf. nur ein Isomer an der Reaktion beteiligt ist. Ein solches Verhalten ist für die Bindung eines in ähnlicher Weise mit einem Coumarin-Fluorophor gelabelten GDP an ein tierisches Rac-Protein beschrieben, wo >90 % des gebundenen GDP an der 3'-Position gelabelt waren.⁹⁵ Für die Trennung der Isomere wurden chromatographische Verfahren herangezogen. Die Dünnschichtchromatographie ergibt zwei Spots, die durch einen Retentionsfaktor von 0,4 (Spot 1) bzw. 0,65 (Spot 2) gekennzeichnet sind. Durch Abkratzen des Silikatmaterials von der Trägerfolie und Elution mit einem Puffer lassen sich die getrennten Substanzen gewinnen. In FCS-Messungen zeigen sie deutlich unterschiedliche Eigenschaften (Tabelle 7). Die molekulare Helligkeit der ersten Fraktion ist um 17 kHz geringer als die der zweiten, auch der Triplettanteil liegt um 8 % niedriger. Diese Ergebnisse deuten auf Unterschiede hinsichtlich des Farbstoffmoleküls hin, die wahrscheinlich in der chemischen Umgebung oder Konformation begründet sind. Eine andere Molekülgeometrie wird auch durch die größere Diffusionszeit für Material aus Spot 1 bestätigt.

Von dem Purinderivat Guanin ist bekannt, dass es durch hydrophobe Wechselwirkungen Komplexe mit anderen Molekülen wie z.B. Fluorophoren bilden und über photoinduzierte Elektronentransferprozesse ein Quenching deren Fluoreszenz bewirken kann.⁹⁶ In dem Konstrukt GTP-Atto befinden sich Guanin und der Atto-Farbstoff verbunden über einen Linker in räumlicher Nähe zueinander, so dass bei geeigneter Konformation ein solcher Quenchingprozess denkbar ist. Zur abschließenden Klärung dieser Möglichkeit sind Angaben hinsichtlich der Redox-Eigenschaften notwendig, die wie auch die chemische Struktur oder

die Farbstoffklasse für Atto488 durch den Hersteller nicht publiziert sind. Folgende experimentelle Ergebnisse können aber im Rahmen eines Quenching durch Guanin interpretiert werden:

- a) Messungen in Gegenwart von Ms-Rac1 zeigen nur für GTP-Atto aus Spot 1 eine Bindung an das Protein, für Spot 2 bleiben alle gemessenen Parameter unverändert. Dieses Verhalten lässt sich zwar auch mit der zu überprüfenden These der Bindung nur eines Isomers des GTP-Atto an das Protein in Einklang bringen. Es ist aber ebenso der Schluss möglich, dass es sich bei dem zweiten Spot um freien Farbstoff handelt, der in dem Produkt noch enthalten war.
- b) Während der Reaktion mit Ms-Rac1 steigt parallel zu dem Bindungsgrad des GTP-Atto aus Spot 1 auch die molekulare Helligkeit an (Abb. 17). Ein Komplex aus Guanin und GTP-Atto würde durch die Bindung des GTP an Ms-Rac1 gelöst und ein Quenching dadurch unterbunden. Die Fluoreszenzintensität des gebundenen GTP-Atto entspricht dem maximalen Wert, die gemessenen Daten stellen den Mittelwert aller Fluorophore dar und sind daher vom jeweiligen Bindungsgrad abhängig.
- c) Die für Spot 1 gemessene Diffusionszeit ist höher und der hydrodynamische Radius des Moleküls demnach größer als für Spot 2. Geht man davon aus, dass sich aus sterischen Gründen nur bei einem Isomer ein Komplex aus Guanin und dem Farbstoff bilden kann, der für ein Quenching notwendig ist, sollte dieser eine kleinere Diffusionszeit aufweisen, da er wahrscheinlich eine kompaktere Geometrie besitzt. Die Ergebnisse zeigen aber eine kleinere Diffusionszeit für die stärker fluoreszierende Fraktion.

	CpM / kHz	τ_D / μ s	Tripletanteil / %
Spot 1	56	32,5	12
Spot 2	84	24,4	21

Tabelle 7: Photophysikalische Eigenschaften und Diffusionszeit der chromatographisch getrennten Fraktionen des GTP-Atto

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass die zwei mittels DC getrennten Fraktionen aus GTP-Atto (Spot 1) sowie freiem Farbstoff Atto488 (Spot 2) bestehen. Der freie Farbstoff zeigt eine höhere molekulare Helligkeit und kleinere Diffusionszeit, als das größere Molekül GTP-Atto. In diesem wird der Farbstoff teilweise durch GTP gequencht, wobei der Komplex bei der Bindung an Ms-Rac1 eine Konformationsänderung erfährt. Dadurch erreicht der Farbstoff seine ursprünglich höhere Fluoreszenzintensität zurück.

Zur Unterstützung dieser Analyse sind die getrennten Fraktionen massenspektrometrisch untersucht worden. Die mittels MALDI-TOF gewonnenen Daten zeigen mehrere Peaks im Bereich 500 – 900 m/z, die als Fragmente zu interpretieren sind. Es ist wahrscheinlich, dass Moleküle, die wie Farbstoffe über ausgedehnte π -Elektronensysteme verfügen, durch die bei diesem Verfahren eingesetzten starken Laserstrahlung beschädigt werden und somit kaum intakt detektiert werden können.

Eine schonendere Ionisierung wird durch ESI erreicht und die so erzielten Ergebnisse zeigen für Proben aus Spot 1 ein Maximum bei 1418 m/z, während bei Spot 2 in diesem Bereich keine Signale auftreten. Auch wenn für GTP-Atto keine Molekülstruktur vorliegt, kann man aus den Massen der einzelnen Komponenten ein Molekulargewicht von ca. 1426 u berechnen, was dem gemessenen Wert nahe kommt. Eine eindeutige Identifizierung der getrennten Moleküle ist ohne die Kenntnis deren Struktur nur schwer möglich, allerdings kann dieses

Ergebnis als Indiz gewertet werden, dass es sich bei der in Spot 1 vorliegenden Substanz um GTP-Atto handelt.

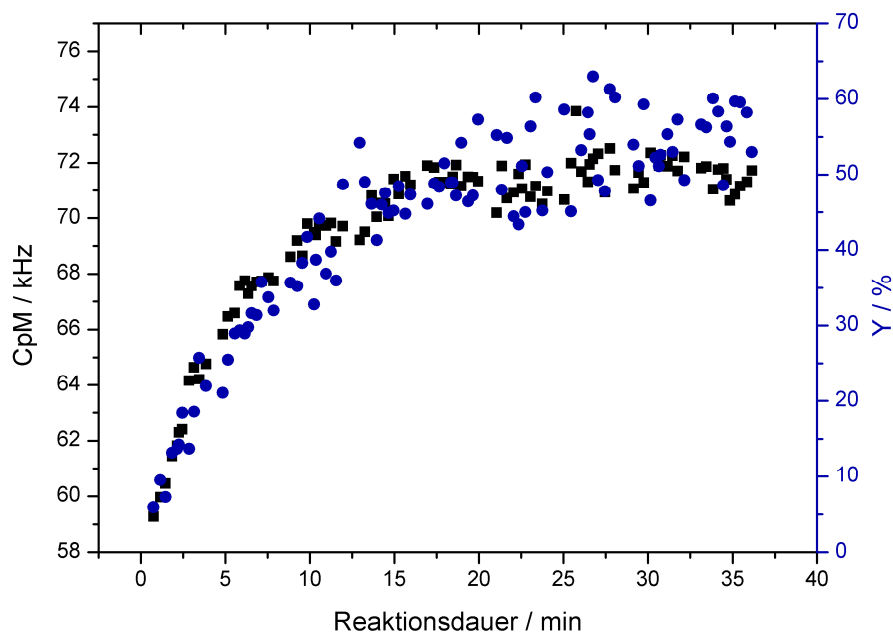


Abb. 17: Die molekulare Helligkeit (CpM) steigt synchron mit dem Anteil an gebundenem GTP-Atto (Y).

Nach diesen Ergebnissen wurden zu einer weiteren Auftrennung der Isomere des GTP-Atto eine Separationen mittels HPLC in einer Ionenaustauschersäule durchgeführt (DEAE-Sepharose, Elutionsmittel 10 mM Tris, pH 7,0 mit einem NH_4Cl -Gradient 0 – 500 mM). Es wurden zwei Peaks detektiert, die entsprechenden Fraktionen wurden ebenfalls durch FCS charakterisiert. Die dabei gewonnenen Ergebnisse gleichen denen, die an den durch DC getrennten Fraktionen gemessen wurden. Damit ist eine weitere Auftrennung in einzelne Isomere durch HPLC nicht nachzuweisen. Ein solches Ergebnis wurde gleichfalls durch HPLC-Messungen seitens des Herstellers bestätigt und tritt für diese Substanzklasse häufig auf.^m Daher bedarf die Frage, in welchen Anteilen verschiedene Isomere des GTP-Atto vorliegen und ob sie sich hinsichtlich der Bindung an Ms-Rac1 unterschiedlich verhalten weiterer Untersuchungen. Ein alternativer Weg liegt in der Synthese basierend auf dGTP (deoxyGTP), das dem natürlichen Substrat GTP ähnelt, aber keine 2'-OH-Gruppe besitzt. Damit würde der Farbstoff allein an der 3'-Position gebunden werden können.

Hier wird deutlich, dass sich die DC verglichen mit anderen chromatographischen Techniken durch geringen technischen und zeitlichen Aufwand auszeichnet und dabei als analytisches Mittel gute Ergebnisse liefert. Besonders in Hinblick auf die geringen Probemengen, die für FCS benötigt werden, lassen sich auch konventionelle Trägerfolien, die zur analytischen DC dienen, präparativ einzusetzen. Mit einem einzelnen Trennlauf ist ausreichend Material für mehrere Hundert FCS-Messungen zu erhalten.

Die Änderung der Fluoreszenzintensität wird häufig für Untersuchungen der GTP-Bindung eingesetzt,⁹³ ist aber für FCS-Messungen hinderlich, da die Auswertung auf einer unveränderten molekularen Helligkeit während der Reaktion beruht. Die standardmäßig erhaltenen Werte des Bindungsgrades (Y_{FCS}) sind durch einen Korrekturterm an die veränderten Parameter anzupassen. Der Wert α beschreibt das Verhältnis der molekularen

^m Persönliche Kommunikation mit Herrn T. Waldbach, Jena Bioscience

Helligkeiten des gebundenen und freien GTP-Atto. Bezogen auf einen Bindungsgrad von 100 % beträgt er $\alpha = 1,5$. Die so berechnete molekulare Helligkeit des GTP-Atto entspricht der des freien Farbstoffs. Für alle Messungen wurde der korrigierte Wert des Bindungsgrades Y_{korr} bestimmt:⁶⁹

$$Y_{\text{korr}} = \frac{Y_{\text{FCS}}}{Y_{\text{FCS}} + \alpha^2(1 - Y_{\text{FCS}})}$$

Formel 37

4.1.2 Aggregation von Ms-Rac1

FCS-Messungen an GTP-Atto und Ms-Rac1 wurden in dem Puffer HBSMD durchgeführt, der schon zur Präparation des Proteins verwandt wurde. Um die GTP-Bindung zu charakterisieren, sind für freies und an Ms-Rac1 gebundenes GTP-Atto die Diffusionszeiten zu bestimmen, die in einem 2-Komponentenfit (Formel 15) als Konstanten eingehen. Freies GTP-Atto weist einen Wert von 30 – 32 μs auf, der Komplex mit Ms-Rac1 wurde bei maximaler Konzentration des Proteins untersucht, um einen möglichst hohen Bindungsgrad zu garantieren. Hier ergaben mehrere individuelle Messungen Ergebnisse von 160 – 400 μs . Solche Schwankungen deuten auf eine heterogene Größenverteilung der GTP-bindenden Spezies hin. In Anbetracht der Masse des Proteins von 21,6 kDa ist eine Diffusionszeit von etwa 100 μs zu erwarten (Formel 9),ⁿ was noch unter dem kleinsten gemessenen Wert liegt. Durch die Aufreinigung des Proteins über die spezifische Erkennung eines gentechnisch an Ms-Rac1 gekoppelten Peptids (Flag-Tag) sind Verunreinigungen mit anderen (insbesondere GTP-bindenden) Proteinen unwahrscheinlich. Elektrophoretische Untersuchungen mittels SDS-PAGE zeigen nur eine Proteinbande, so dass die Präsenz weiterer Proteine ausgeschlossen werden kann. Es ist also davon auszugehen, dass Ms-Rac1 in der Probe zumindest teilweise in aggregierter Form vorliegt. Infolge einer Denaturierung von Proteinen kann es zu einer Koagulation kommen. Damit sollte aber auch die Konformation, die für eine Bindung von GTP notwendig ist gestört werden. Die FCS-Messungen zeigen allerdings klar, dass auch aggregiertes Ms-Rac1 die Fähigkeit behält, GTP zu binden und somit in einer weitgehend nativen Konformation vorliegen sollte.

Für die Stabilität der Proteinstruktur spielt neben dem pH-Wert die Ionenstärke des Mediums eine wichtige Rolle. So können beispielsweise elektrostatische Wechselwirkungen geladener Aminosäuren kompensiert oder hinsichtlich ihrer Reichweite beeinflusst werden.⁹⁹ Zur Untersuchung des Effekts veränderter Ionenstärke wurden FCS-Messungen in HBSMD durchgeführt, wobei die Konzentration an NaCl, MgCl₂ oder CaCl₂ variiert wurden. Diese Ionen bieten sich an, da sie gemäß ihrer Position in der Hofmeister-Serie einen eher neutralen Einfluss auf die Löslichkeit sowie Stabilität der nativen Konformation von Proteinen ausüben sollten.¹⁰⁰ Damit beruht ihre Wirkung vor allem auf der Ionenstärke. Nach Inkubation von GTP-Atto und Ms-Rac1 in einer Lösung reduzierter Konzentration an MgCl₂ wurde sukzessiv MgCl₂ zugesetzt. Die Diffusionszeit des Komplexes sinkt deutlich bei steigender Salzkonzentration von etwa 380 μs auf 150 μs bei 17 μM bzw. 10 mM MgCl₂ (Abb. 18 b). Bei einer Zugabe von NaCl oder MgCl₂ zu GTP-Atto und Ms-Rac1 in HBSMD bis zu einer Endkonzentration von 300 mM bzw. 30 mM fällt die Diffusionszeit des Komplexes auf 130 μs . Ähnliche Ergebnisse sind auch mit CaCl₂ erhalten worden. Diese Resultate zeigen,

ⁿ Hierbei geht auch die Molekülgeometrie in die Betrachtung ein, die im Fall von Ms-Rac1 belegt durch Homologiemodelling der des Hs-Rac2 ähneln sollte.¹⁷ Auf Basis der bekannten 3D-Struktur des Hs-Rac2⁹⁷ wurden der Diffusionskoeffizient (Software Hydropro⁹⁸) und daraus die Diffusionszeit berechnet.

dass Ms-Rac1 bei physiologischen Salzkonzentrationen Homo-Oligomere ausbildet, die bei höherer Ionenstärke dissoziieren. In den standardmäßig durchgeführten elektrophoretischen Untersuchungen mittels SDS-PAGE ist ein solches Verhalten prinzipiell nicht detektierbar, da diese Technik eine vollständige Entfaltung der Proteine bewirkt und diese damit immer als Monomere vorliegen.

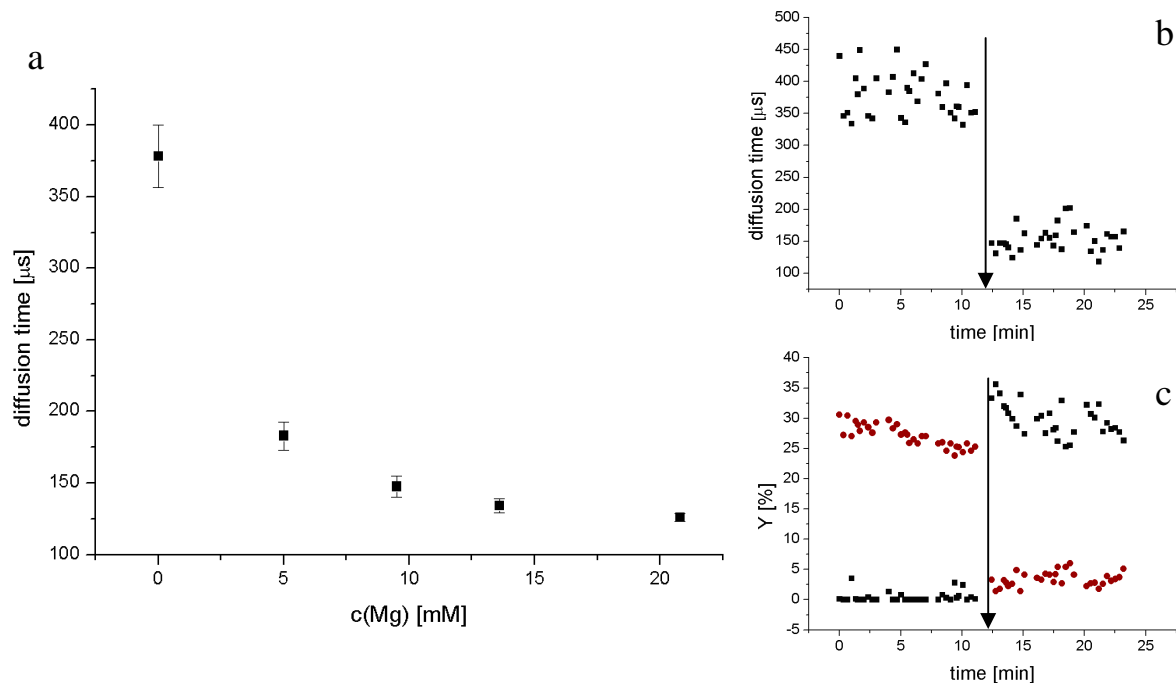


Abb. 18: Die Diffusionszeit von GTP-Atto gebunden an Ms-Rac1 (2Komponenten-Fit) in Abhängigkeit der Mg-Konzentration in HBSMD (a). Die Zugabe von MgCl₂ auf 10 mM (Pfeil) senkt die Diffusionszeit des Komplexes (2Komponenten-Fit) instantan von ca. 380 auf 150 μs (b). In einem 3Komponenten-Fit (c) erkennt man die Zunahme an monomerem Ms-Rac1 (schwarz) auf Kosten der oligomeren Fraktion (rot).

In der Literatur werden vergleichbare Beobachtungen an drei humanen Proteinen der Rho-Familie beschrieben. Hs-Rac2 und Cdc42 bilden Dimere, wofür eine polybasische Sequenz von Aminosäuren am C-Terminus verantwortlich gemacht wird.¹⁰¹ Das Protein Hs-Rac1 verfügt über einen mit 6 AS ausgeprägteren basischen Bereich, wobei in dem Fall Homo-Oligomere aus ca. 24 Proteinen gebildet werden. Eine erhöhte Salzkonzentration führt zu einer Dissoziation in Monomere, wobei Magnesium als mehrwertiges Kation einen größeren Effekt hat, als es für Natrium beschrieben wird.¹⁰² Ein Sequenzvergleich zwischen Hs-Rac1 und Ms-Rac1 zeigt, dass beide Proteine einen vergleichbaren polybasischen Bereich aufweisen (Hs-Rac1¹⁸³KKRKRK¹⁸⁸, Ms-Rac1¹⁸⁴KKKKNK¹⁸⁹). Damit ist auch für Ms-Rac1 die Bildung von Oligomeren nach Modell des humanen Homologen als Erklärung der erhöhten Diffusionszeit plausibel.

Da sowohl monomeres Ms-Rac1 als auch seine Oligomere die Fähigkeit besitzen, GTP-Atto zu binden, wird für die Analyse der FCS-Daten ein Modell mit 3 Komponenten notwendig, die sich hinsichtlich der Diffusionszeit unterscheiden. Aus Messungen werden für freies sowie an Oligomere gebundenes GTP-Atto 30 μs bzw. 380 μs bestimmt. Auf Basis der bekannten Masse des Moleküls ist die Diffusionszeit für monomeres Ms-Rac1 auf ca. 100 μs zu berechnen. Experimentell ist dieser Wert nicht zugänglich, da auch bei den höchsten eingesetzten Salzkonzentrationen (300 mM NaCl) nicht sicher ist, dass die Oligomere vollständig dissoziieren. Für Hs-Rac1 nimmt der Effekt der Salzkonzentrationen mit zunehmender Konzentration ab, bei 300 mM NaCl liegen noch ca. 40 % des Proteins als

Oligomer vor.¹⁰² Schon diese Salzkonzentration ist relativ hoch, so dass eine weitere Steigerung zu extrem unphysiologischen Bedingungen führt. Analysiert man das anfangs beschriebene Experiment der Magnesiumabhängigkeit der Diffusionszeit mit einem durch diese Werte charakterisierten 3-Komponentenfit, werden folgende Veränderungen erkennbar (Abb. 18c): Zu Beginn bei niedrigen Mg-Konzentrationen liegt praktisch kein monomeres Ms-Rac1 vor, durch Erhöhung der Salzkonzentration steigt der Anteil sprunghaft an. In gleicher Weise sinkt der Anteil des Oligomers ab, wobei für mittlere Konzentrationen für beide Fraktionen ein anfängliches Überschießen der Dissoziationsreaktion zu beobachten ist, das möglicherweise in ein Gleichgewicht läuft. Der Anteil des Oligomers fällt bei 10 mM MgCl₂ auf ca. 3 – 5 %.

Magnesium spielt als Kofaktor für die Bindung und Hydrolyse von GTP eine entscheidende Rolle, so dass seine Konzentration für die Untersuchungen dieses Effektes variabel bleiben muss. Da für NaCl weniger Einfluss auf die funktionalen Eigenschaften von Ms-Rac1 zu erwarten ist, wird für die Messung der thermodynamischen und kinetischen Parameter der GTP-Bindung als Reaktionspuffer HBSMD mit einer auf 300 mM angehobenen Konzentration an NaCl eingesetzt. Zur Analyse kommt ein 3-Komponentenfit zum Einsatz, wie er hier beschrieben ist. Unter diesen Bedingungen beträgt der Anteil des durch das Oligomer gebundenen GTP-Atto ca. 5 %. In der Auswertung der Daten bezieht sich der Bindungsgrad *Y* im Folgenden auf den durch monomeres Ms-Rac1 gebundenen Anteil des GTP-Atto.

Die auf FCS-Messungen beruhenden Resultate hinsichtlich des Aggregationsverhaltens von Ms-Rac1 beziehen sich bedingt durch die Methode auf Proteine und Oligomere, die GTP-Atto gebunden haben. Daher ist eine unabhängige Methode zur Verifizierung der Aussagen heranzuziehen. Zu diesem Zweck wurden AFM-Abbildungen der Proteine hinsichtlich deren Durchmesser ausgewertet. Ms-Rac1 wurde in HBSMD mit 25 bzw. 300 mM NaCl inkubiert und aufgrund seiner positiven Nettoladung elektrostatisch auf einer Glimmeroberfläche immobilisiert. Die Abbildungen zeigen einzelne Protein-Spots von wenigen nm Höhe (Abb. 19 a, b). Die statistische Auswertung der Partikelhöhe ergibt zwei Populationen (Abb. 19 c), die mit einer Gauß-Kurve gefittet wurden. Das Maximum des ersten Peaks liegt bei $2,0 \pm 0,1$ nm bzw. $1,7 \pm 0,1$ nm für 25 oder 300 mM NaCl, während der zweite Peak sich bei $7,2 \pm 0,1$ nm bzw. $6,4 \pm 0,2$ nm befindet. Die erste Population ist bei 300 mM NaCl dominant, niedrige Salzkonzentrationen führen zu vermehrtem Auftreten der größeren Partikeldurchmesser. Damit können die beiden Populationen monomerem und oligomerem Ms-Rac1 zugeordnet werden.

Aus den FCS-Messungen ergibt sich eine um den Faktor 3,8 höhere Diffusionszeit der Oligomere verglichen mit dem für monomeres Ms-Rac1 anzunehmenden Wertes. Daraus folgt bei etwas sphärischer Gestalt eine 55fach höhere Masse der Oligomere. AFM-Abbildungen auch in höherer Auflösung sprechen ebenso für eine Kugelform der Oligomere. Aus dem Verhältnis der so bestimmten Durchmesser resultiert ergibt sich, dass die Oligomere aus ca. 50 Molekülen Ms-Rac1 bestehen. Dies zeigt eine gute Übereinstimmung der Daten beider Methoden.

Diese rasterkraftmikroskopischen Ergebnisse stellen einen weiteren Beleg für die Bildung von Oligomeren durch Ms-Rac1 dar und machen die Abhängigkeit dieses Vorgangs von der Salzkonzentration deutlich. Durch FCS konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Fähigkeit, GTP zu binden sowohl für monomeres als auch für oligomerisiertes Ms-Rac1 besteht. Damit eröffnen sich regulatorische Möglichkeiten, die sich auf die Signaltransduktion *in vivo* auswirken können. Das homologe humane Hs-Rac1 betreffend werden durch die Oligomerisierung eine verstärkte katalytische Aktivität der GTPase selbst sowie die Veränderungen vielfältiger Interaktionen mit anderen Proteinen hervorgerufen.¹⁰² Die hier an

Ms-Rac1 gezeigten Parallelen legen ein vergleichbares Repertoire an Kontrollmechanismen in pflanzlichen Systemen nahe.

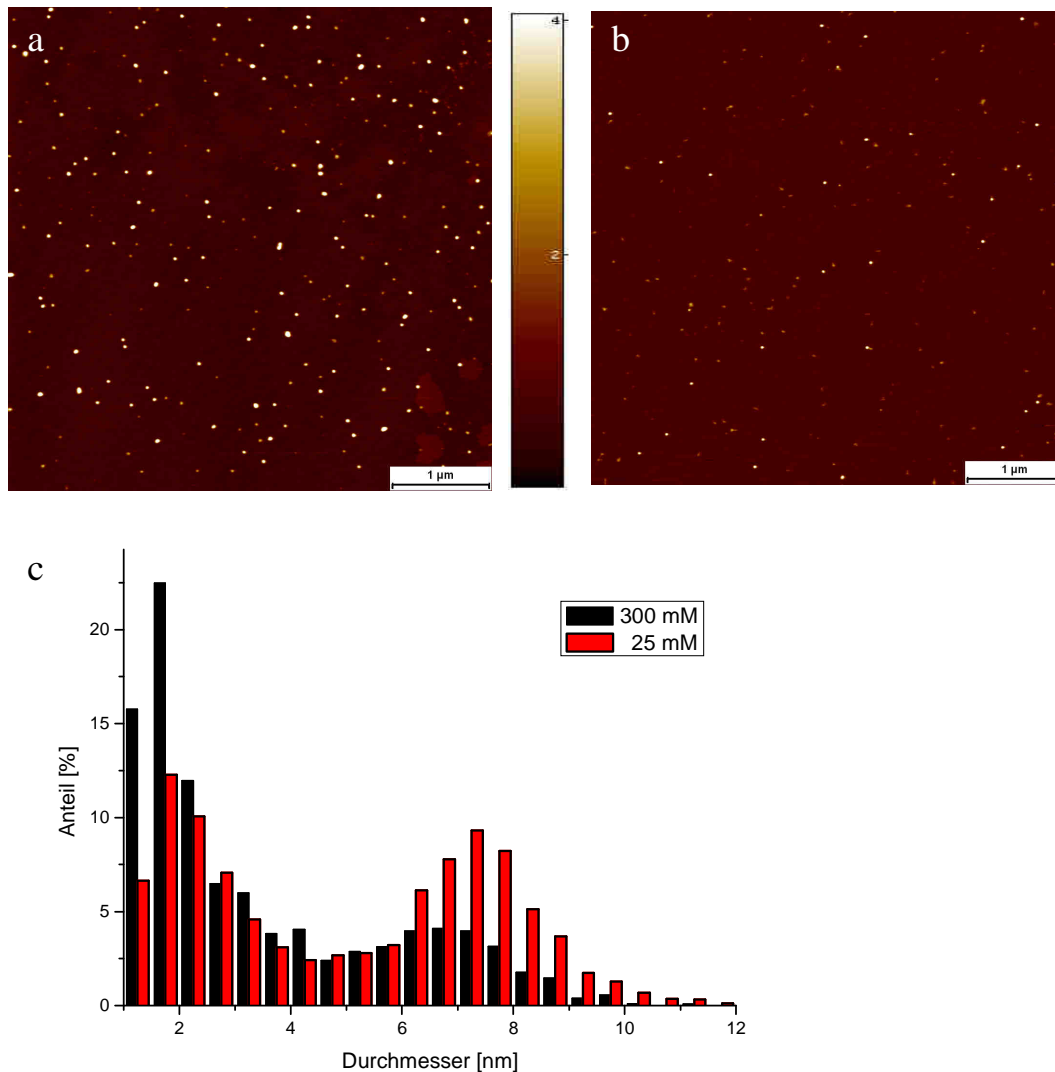


Abb. 19 Der Einfluss der Salzkonzentration auf die Oligomerisation von Ms-Rac1: AFM-Abbildungen von Ms-Rac1 in HBSMD mit 25 mM (a) und 300 mM (b) NaCl. Ein Histogramm der Größenverteilung (c) zeigt zwei Populationen, die monomeres (ca. 2 nm) und oligomeres (ca. 7 nm) Ms-Rac1 entsprechen. Deren relativer Anteil ist abhängig von der Salzkonzentration (schwarz 300 mM, rot 25 mM NaCl).

4.1.3 Bindungskinetik in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration

Magnesium spielt in kleinen G-Proteinen sowohl für die Bindung von GTP als auch für dessen Hydrolyse eine entscheidende Rolle. Mehrere 3D-Proteinstrukturen zeigen, dass es als Kofaktor in der Bindungstasche Sauerstoffatome des β - und γ -Phosphats koordiniert und in dieser Weise das gebundene GTP stabilisiert.⁹ Damit hat Magnesium markanten Einfluss auf die Bindungskinetik verschiedener menschlicher Rho-Proteine.^{95,103} Die Auswirkungen auf die Kinetik der Assoziation und Dissoziation von GTP-Atto und Ms-Rac1 sind daher in Abhängigkeit von der Konzentration an freiem Magnesium untersucht worden.

Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 20,6 μM in HBSMD-Puffer und 300 mM NaCl durchgeführt. Zur Einstellung der Konzentration des freien Magnesiums ist der Komplexbildner EDTA zugesetzt worden, der den Anteil des für das Protein zugänglichen Magnesiums von 5 mM auf wenige μM reduziert. Die jeweilige Mg-Konzentration wurde durch das Programm winmaxc32¹⁰⁴ unter Verwendung von $K_D = 2,4 \mu\text{M}$ bei pH 7,5 und 22 °C berechnet zu 3,5, 6,7, 12,2 sowie 395 μM . Gegenüber der direkten Zugabe der entsprechenden Menge an Magnesium in den Puffer hat dieses Verfahren einen Vorteil, der insbesondere bei den hier notwendigen Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich zum tragen kommt: Es besteht eine hohe Affinität zwischen G-Proteinen und Magnesium mit einer K_D von einigen μM ,^{95,105} so dass mit dem in HBSMD gelagerten Protein in die Messlösung eine mindestens äquimolare Menge an Magnesium (20,6 μM) eingebracht und kleinere Werte nicht zugänglich sind. Bei der hier gewählten Methode werden durch die großen Konzentrationen sowohl an Magnesium als auch an EDTA solche Effekte abgepuffert. Damit haben sie zu vernachlässigende Auswirkungen auf die Gleichgewichtskonzentration an freiem Magnesium, die so genau bestimmt werden kann.

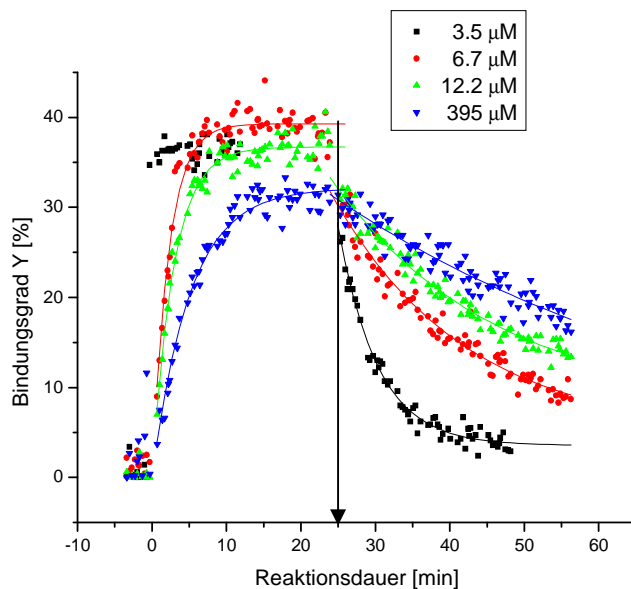


Abb. 20 Bindungskinetik des GTP in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration, die Kurven sind versetzt dargestellt, um den Startpunkt der Dissoziation zu synchronisieren. Hierzu wurde ein 1000facher Überschuss an ungelabeltem GTP zugesetzt (Pfeil).

Die Auswertung der FCS-Daten zeigt, dass der Anteil Y des von monomerem Ms-Rac1 gebundenen GTP-Atto abhängig von der Reaktionsdauer ansteigt (Abb. 20). Für Magnesiumkonzentrationen $\geq 6,7 \mu\text{M}$ ist ein exponentieller Verlauf gemäß

$$Y = Y_{final} \cdot (1 - \exp(-t/\tau)) \quad \text{Formel 38}$$

mit einer Zeitkonstante τ und einem Endwert Y_{final} zu beobachten. Die Zeitkonstante sinkt mit fallender Konzentration an Magnesium (Tabelle 8) so dass bei 3,5 μM ein instantaner Sprung auf den Gleichgewichtswert auftritt, da die Methode Reaktionen dieser Geschwindigkeit nicht mehr auflösen kann (Messbeginn ca. 40 s nach Zugabe). Der exponentielle Verlauf deutet auf eine Reaktion pseudo-erster Ordnung hin, was in Anbetracht der verglichen mit GTP-Atto

(ca. 20 nM) um mehrere Zehnerpotenzen höheren Konzentration an Ms-Rac1 zu erwarten ist. Eine genauere Diskussion der Reaktionskinetik findet in folgenden Abschnitt statt.

Die Dissoziation wurde nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts durch Zugabe eines 1000fachen Überschusses an ungelabeltem GTP initiiert, durch das freie Bindungsstellen des Proteins blockiert werden. Der Bindungsgrad des GTP-Atto nimmt daraufhin exponentiell mit einer Zeitkonstante t_{diss} ab, wobei die Reaktion bei kleinen Magnesiumkonzentrationen wiederum am schnellsten verlaufen (Tabelle 8). Das kann als Indiz dafür gewertet werden, dass der Dissoziation von GTP die des Magnesiums vorausgeht. Diese verläuft bei kleinen Mg-Konzentrationen schneller, da eine Rückreaktion seltener auftritt. Eine solche Dissoziationsreihenfolge wurde für Rac1 und Ras beschrieben und deutet möglicherweise einem allgemeiner gültigen Mechanismus an,⁹⁵ der gemäß den hier beschriebenen Messungen auch bei pflanzlichen Proteinen vorkommen kann. Einem solchen Verhalten kann eine biologische Relevanz zukommen, wenn man bedenkt, dass *in vivo* der Austausch des GDP gegen GTP durch weitere Proteine kontrolliert verläuft. In diesem Fall bewirkt die Interaktion mit einem GEF-Protein unter anderem die Verdrängung des Magnesiums, wodurch das gebundene GDP leichter dissoziieren kann.^{103,106} GEFs sind auch in Pflanzen identifiziert worden¹⁰⁷ und haben dort wahrscheinlich einen ähnlichen Wirkungsmechanismus.¹⁰⁸

[Mg] / μM	t_{ass} / min	t_{diss} / min	k_{diss} / min^{-1}
3,5		$3,7 \pm 1,1$	$0,27 \pm 0,04$
6,7	$2,3 \pm 0,2$	$11,5 \pm 2,9$	$0,09 \pm 0,02$
12,2	$3,5 \pm 0,7$	$15,8 \pm 0,6$	$0,06 \pm 0,01$
395,0	$6,0 \pm 2,1$	$45,0 \pm 24,0$	$0,02 \pm 0,02$

Tabelle 8: Bindungskinetik des GTP in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration, Mittelwert \pm SD, jeweils 3 Messungen

Betrachtet man die off-Rate k_{diss} als Funktion der Magnesiumkonzentration (Abb. 21), deutet sich ein hyperbolischer Verlauf an. Auch dieses Verhalten deckt sich mit den publizierten Daten des Hs-Rac1⁹⁵ wie auch Ras (hier Dissoziation von GDP)¹⁰⁹ so dass bei einer größeren Anzahl an Messpunkten die off-Rate des Magnesiums aus einer gefitteten Kurve bestimmt werden kann.

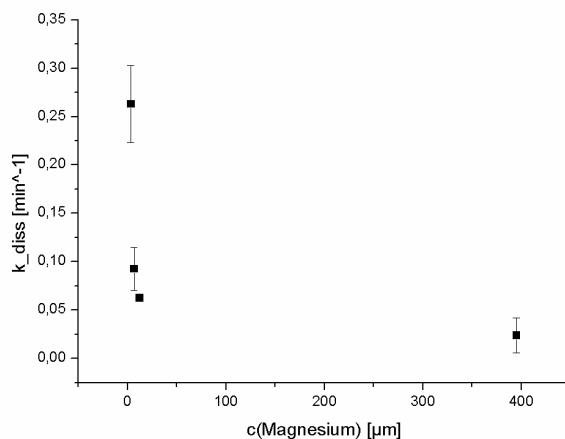


Abb. 21 Geschwindigkeitskonstante k_{diss} von Ms-Rac1 und GTP in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration

4.1.4 Thermodynamik und Kinetik

Die zentralen Größen, die eine Bindungsreaktion charakterisieren, sind die Dissoziationskonstante K_D sowie die kinetischen on- und off-Raten. Diese Parameter sind durch FCS-Messungen für Ms-Rac1 und GTP-Atto bestimmt worden. Dazu wurde der zeitliche Verlauf der GTP-Bindung verfolgt und für verschiedene Konzentrationen an Ms-Rac1 ausgewertet. Die Messungen wurden in HBSMD mit 300 mM NaCl durchgeführt, so dass das Protein weitgehend in monomerer Form vorlag. Zur Auswertung kam nur der von den Monomeren gebundene Anteil des GTP-Atto. Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, kommt es während der Reaktion zu einer zeitabhängigen Zunahme des Bindungsgrades gemäß Formel 38. Y_{final} und τ sind abhängig von der Konzentration des Ms-Rac1, wodurch die thermodynamischen und kinetischen Parameter zu bestimmen sind.

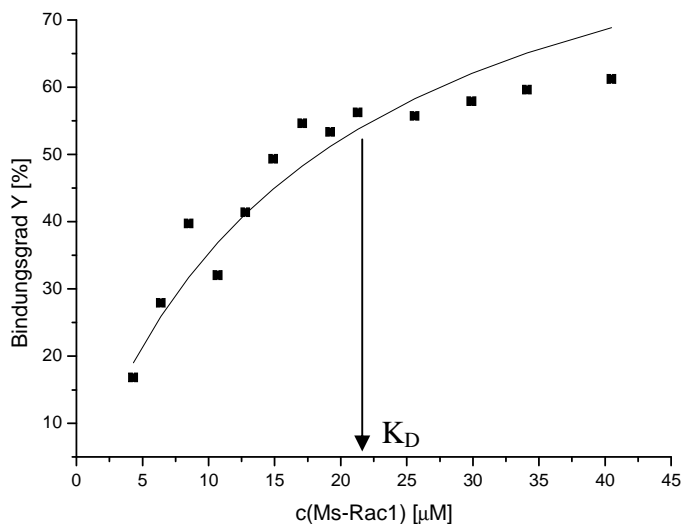


Abb. 22 Der Bindungsgrad Y von GTP-Atto in Abhängigkeit der Konzentration an Ms-Rac1. Die Dissoziationskonstante K_D beträgt $18,3 \mu\text{M}$.

Eine Auftragung von Y_{final} gegen die Proteinkonzentration zeigt einen hyperbolischen Verlauf (Abb. 22), der durch folgende Gleichung in Abhängigkeit von den Ausgangskonzentrationen an GTP-Atto $[GTP]_0$ und Ms-Rac1 $[Rac]_0$ beschrieben wird:¹¹⁰

$$Y_{final} = \frac{K_D + [Rac]_0 + [GTP]_0 - \sqrt{(K_D + [Rac]_0 + [GTP]_0)^2 - 4[Rac]_0[GTP]_0}}{2[GTP]_0} \quad \text{Formel 39}$$

Damit ergibt sich für die Dissoziationskonstante K_D eine Größe von $18,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Andere G-Proteine weisen meist deutlich kleinere Werte im pico- und nanomolaren Bereich auf,¹⁰³ beispielsweise 240 nM für Hs-Rac1.¹⁰³ Man kann davon ausgehen, dass auch Ms-Rac1 eine signifikant höhere Affinität zu GTP aufweist als diese Auswertung anzeigt. Die Differenz ist hier weitgehend durch eine unterschiedliche Präparation des Proteins zu erklären. Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Guanin-Nucleotiden werden G-Proteine mit einem intrinsisch

gebundenen GDP-Molekül isoliert (nach der Hydrolyse des GTP zu GDP verbleibt dieses in der Bindungstasche). In Anbetracht der großen Magnesiumkonzentration in dem zur Aufreinigung eingesetzten Puffer erfolgt eine Dissoziation nur langsam und bei wenigen Proteinen. Somit ist der Anteil des Apo-Proteins - das heißt des Ms-Rac1, das zur Bindung von GTP-Atto zur Verfügung steht - begrenzt. Das erklärt den vergleichsweise niedrigen maximal erreichbaren Bindungsgrad der GTP-Atto von ca. 60 % auch bei einer relativ hohen eingesetzten Proteinkonzentration.

Für die Entfernung des GDP sind hinsichtlich anderer G-Proteine Methoden beschrieben, die meist die beschleunigte Dissoziation in magnesiumfreiem Medium ausnutzen und eine Abtrennung des GDP durch Membranfiltration oder Dialyse beinhalten.^{103,111} Da der Einfluss des Magnesiums auch bei Ms-Rac1 nachgewiesen werden konnte, wurde ein solches Verfahren hier evaluiert. Dabei hat sich herausgestellt, dass das solcherart behandelte Ms-Rac1 keine GTP-Bindung mehr zeigt. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der Stabilität des Proteins begründet, die für Apo-Proteine allgemein als sehr gering beschrieben wird. Beispielsweise besitzt nucleotidfreies humanes Ras bei 25°C eine Halbwertszeit von ca. 2h.¹¹¹ Aus diesem Grund ist bei dem Protein, das für die FCS-Untersuchungen bereit gestellt wurde, auf die Entfernung des GDP verzichtet worden. Die in diesem Fall zur Verfügung stehenden Mittel zur Präparation von Proteinen sind begrenzt und haben sich als nicht ausreichend erwiesen, aktives Ms-Rac1 in nucleotidfreier Form zu präparieren.

Die gemessene Dissoziationskonstante für Ms-Rac1 ist somit als oberer Grenzwert für diesen Parameter zu verstehen und erweitert die bislang zu diesem Protein verfügbaren Ergebnisse, die diese wichtige Größe nicht umfassen.¹⁷ Dabei unterstreichen die Messungen selbst die gute Eignung von FCS zur Untersuchung der GTP-Bindung von G-Proteinen. Der geringe Probenbedarf von wenigen µl ist insbesondere bei solchen sensiblen Proben gegenüber anderen Methoden ein Vorteil und kann damit sogar während der Präparation zur Kontrolle der einzelnen Schritte genutzt werden.

Zur Charakterisierung der Kinetik der Bindungsreaktion wird der zeitliche Verlauf der Reaktion verfolgt. Dieser ist wie schon bei reduzierter Magnesiumkonzentration auch bei 5 mM Magnesium durch eine Exponentialfunktion zu beschreiben (Formel 38). Daraus können Erkenntnisse hinsichtlich der zugrunde liegenden Reaktionsordnung gewonnen werden. Eine solche Zeitabhängigkeit – oder eher die korrespondierende exponentielle Abnahme der Konzentration des freien GTP-Atto – ist bei einer Reaktion erster Ordnung zu beobachten.¹¹² Im hier vorliegenden Fall ist von einer Reaktion pseudo-erster Ordnung auszugehen, da auch der Bindungspartner Ms-Rac1 zu betrachten ist. Dessen Konzentration übersteigt die des GTP-Atto allerdings um ein Vielfaches, so dass man sie während der Reaktion als konstant annehmen kann. In diesem Fall ist die inverse Relaxationszeit $1/\tau$ proportional zur Konzentration des Ms-Rac1 und ermöglicht die Bestimmung der beiden Geschwindigkeitskonstanten k_{ass} und k_{diss} gemäß der Gleichung:

$$\frac{1}{\tau} = k_{diss} + k_{ass} \cdot [Ms - Rac1] \quad \text{Formel 40}$$

Die gemessenen Werte zeigen wie erwartet einen solchen linearen Zusammenhang (Abb. 23), was einen experimentellen Beleg für die angenommene Reaktionsordnung darstellt. Die Geschwindigkeitskonstanten betragen damit $k_{diss} = 0,018 \text{ min}^{-1}$ und $k_{ass} = 0,004 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$.

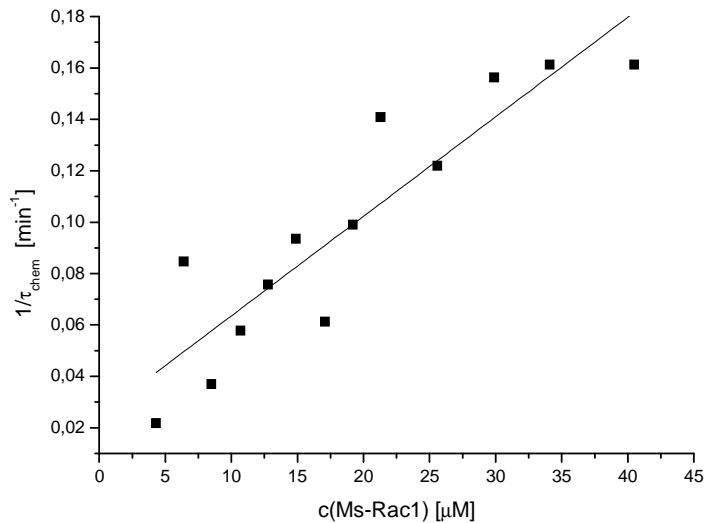


Abb. 23 Auswertung der Reaktionskinetik: Die inverse Relaxationszeit τ ist linear von der Konzentration an Ms-Rac1 abhängig und erlaubt die Bestimmung von k_{diss} sowie k_{ass}

Die Größe von k_{ass} wird dabei auch durch die Proteinkonzentration bestimmt, die wie schon in Hinblick auf die Dissoziationskonstante K_D dargelegt wurde, hier effektiv niedriger anzunehmen ist. Daher sind $0,004 (\mu\text{M}\cdot\text{min})^{-1}$ als unterer Grenzwert für k_{ass} zu verstehen. Der Parameter k_{diss} ist von diesem Effekt unabhängig und enthält entscheidende Informationen über die Wechselwirkung von Ms-Rac1 und GTP, wie in folgenden Analysen gezeigt wird. Vergleicht man die auf diese Weise bestimmte off-Rate mit der direkt gemessenen (bei der größten Magnesiumkonzentration von $395 \mu\text{M}$), erkennt man eine Übereinstimmung beider Werte. Dieses Resultat ist eine klare Bestätigung der Ergebnisse, die einerseits durch die direkte Messung sowie auch die lineare Regression erhalten wurden. Eine solche Vergleichbarkeit ist in Anbetracht der unterschiedlichen Konzentration des Magnesiums bei beiden Methoden natürlich zu überprüfen. In Anbetracht der (wahrscheinlich) hyperbolischen Abhängigkeit der off-Rate von der Magnesiumkonzentration (Abb. 21) liegt es nahe, dass der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Dissoziation des GTP-Atto sich oberhalb von ca. $400 \mu\text{M}$ nicht mehr signifikant ändert. Auch dafür kann dieses Ergebnis nun einen Beweis liefern. Darüber hinaus ist der Wert der hier bestimmten off-Rate in guter Übereinstimmung mit dem anderer G-Proteine, so wurde für das humane Hs-Rac1 bei 10 mM Magnesium $k_{diss} = 0.031 \text{ min}^{-1}$ ermittelt.¹⁰³ Dieser Wert verdeutlicht nochmals die markante Homologie, die zwischen dem humanen und dem pflanzlichen Protein besteht.

4.1.5 Zusammenfassung

Durch die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit ist die Bindungsreaktion zwischen dem pflanzlichen Protein Ms-Rac1 und GTP-Atto umfassend charakterisiert worden. Thermodynamische und kinetische Parameter wurden durch FCS bestimmt und es ist eine obere Grenze von $18,3 \mu\text{M}$ für die Dissoziationskonstante K_D sowie eine off-Rate von $0,018 \text{ min}^{-1}$ in guter Übereinstimmung mit dem homologen humanen Protein Hs-Rac1 gemessen worden. Die Bedeutung von Magnesium als Kofaktor der GTP-Bindung wurde evaluiert und es konnten gesteigerte Reaktionsraten bei einer reduzierten Konzentration an Magnesium festgestellt werden. Darüber hinaus wurde die Bildung von funktionalen

Homo-Oligomeren durch das Protein Ms-Rac1 in Abhängigkeit von der Ionenstärke belegt. Ein solcher Vorgang ist für das humane Hs-Rac1 beschrieben und wird durch eine polybasische Aminosäuresequenz hervorgerufen, die ebenso bei Ms-Rac1 vorkommt. Damit eröffnen sich komplexere Interaktionsmöglichkeiten zur Kontrolle der Signaltransduktion durch Ms-Rac1. Diese Resultate stellen den experimentellen Beleg für die funktionale Homologie des pflanzlichen Ms-Rac1 zu den humanen Hs-Rac1 und Hs-Rac2 dar, die aufgrund struktureller Daten vermutet wurde. Die Transfermöglichkeit von Erkenntnissen aus tierischen auf pflanzliche Signalwege wird so untermauert und weitere Untersuchungen stimuliert. Beispielsweise stellt eine Erweiterung des bestehenden Systems zur Analyse der Interaktion von Ms-Rac1 mit Rho-GDI ein vielversprechendes und realistisches Konzept dar. Dabei wären nicht nur der Einfluss auf die Bindungskinetik leicht zu messen sondern auch eine mögliche Dissoziation der Oligomere von Ms-Rac1 durch die Interaktion mit Rho-GDI.

Diese Arbeit stellt eine der ersten Studien zur Untersuchung der GTP-Bindung an kleinen G-Proteinen mittels FCS dar und die Technik hat sich dabei als ein sehr geeignetes Instrument erwiesen, das vielschichtige Informationen liefert. Neben der Bindung des Liganden werden photophysikalische und hydrodynamische Parameter bestimmt, die in dieser Kombination mit anderen Methoden schwer zu realisieren sind. Das geringe benötigte Testvolumen macht FCS geeignet für kostbare und empfindliche Proben (wie Apo-Proteine). Weiterhin ist eine Messung in lebenden Zellen möglich, so dass die an isolierten Proben gewonnenen Resultate mit derselben Methode am zellulären System überprüft werden können.

4.2 Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen

4.2.1 Eigenschaften der Nanopartikel

Im Rahmen des Projektes NanoCare wurde eine Vielzahl an zumeist metalloxidischen NP synthetisiert, die nach einer umfassenden Charakterisierung den verschiedenen biologischen Test unterzogen wurden. Im Hinblick auf die Charakterisierung der NP liefert die Rasterkraftmikroskopie dreidimensionale Darstellungen, die über die üblicherweise von den Partikelherstellern durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen hinausgehende Informationen enthalten. So lassen sich Oberflächenstrukturen einzelner Partikel analysieren und mit Umgebungsbedingungen korrelieren (Proteinadsorption). Die Form auch der koagulierten NP wird detailliert vermessen und lässt Rückschlüsse auf Veränderungen der Agglomerate beispielsweise während der Trocknung einer Dispersion zu. Weiterhin sind Statistiken der 3D-Größenverteilung der Partikel und deren Agglomerate zugänglich.

Die Mehrzahl der untersuchten NP wird durch Reaktionen in der Gasphase hergestellt, wobei die eingesetzten Temperaturen in der Regel zu Sinterprozessen und der Bildung von Aggregaten führen. Diese Strukturen lassen sich in der weiteren Behandlung nicht wieder in Primärpartikel zerlegen. Im Gegensatz dazu entstehen bei der Herstellung durch Flüssigphasenprozesse NP, die in einem geeigneten Medium als einzelne Primärpartikel stabil sind. Dabei spielen der pH-Wert der Dispersion aber auch an der Partikeloberfläche gebundene Moleküle (z.B. Polyoxasäure als Stabilisator) eine Rolle. Das ist am Beispiel von TiO₂-Partikeln deutlich erkennbar, da hier Proben gleicher chemischer Zusammensetzung vorliegen, die nach unterschiedlichen Verfahren produziert wurden (Abb. 24a, b). Zur Stabilisierung dieser beiden Proben wurde nur 1 mM HNO₃ eingesetzt. Ein Gauß-Fit der Größenverteilung von TiO₂ aus der Flüssigphase (Abb. 24d) ergibt für die Primärpartikel einen mittleren Durchmesser von $5,1 \pm 0,9$ nm. Auch bei höherer Vergrößerung sind für in der Gasphase erzeugtes TiO₂ kaum einzelne Primärpartikel erkennbar, was sich mit den Herstellerangaben deckt. Denen zufolge beträgt der anhand von elektronenmikroskopischen Daten ermittelte Durchmesser (d_{50}) der Primärteilchen 27,2 nm.^o Die in AFM-Aufnahmen vermessene mittlere Höhe liegt mit 63 ± 40 nm für Abb. 24c erwartungsgemäß darüber, da es sich hier um Cluster von NP handelt.

^o Herstellerangabe für Partikel des Typs P25

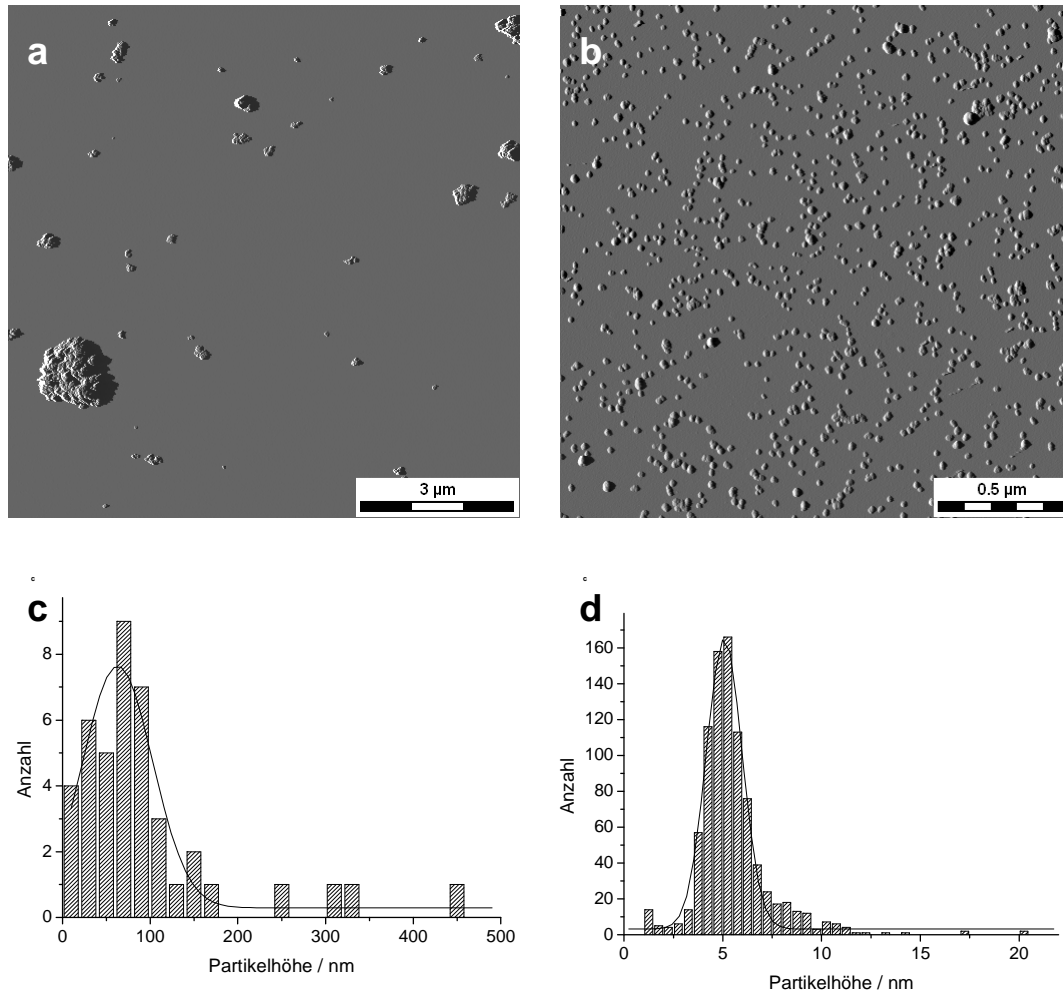
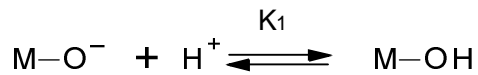


Abb. 24 AFM-Amplitudenbild von TiO₂-NP aus 1mM HNO₃ auf Glimmer aufgetrocknet, NP aus Gasphasensynthese zeigen eine aggregierte Form (a, TiO₂ (Typ 1.2)), während NP aus Flüssigphasensynthese weitgehend als Primärpartikel vorliegen (b). Verteilung der maximalen Höhe der einzelnen Aggregate bzw. Partikel aus Gasphasensynthese (c) und Flüssigphasensynthese (d).

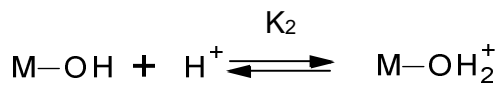
Die Aggregation von NP während der Synthese führt zu praktisch irreversiblen Veränderungen der Anordnung der Partikel, die auch das Verhalten in Dispersionen und bei der Interaktion mit biologischen Zellen beeinflussen kann. Davon zu unterscheiden ist die reversible Agglomeration, die nach der Produktion der Partikel einsetzt und durch die Umgebungsbedingungen und Präparationsschritte bis zum Kontakt mit den Zellen bedingt ist.^{53,113} Für die hier durchgeführten Untersuchungen sind die Partikeleigenschaften in wässriger Dispersion ausschlaggebend, die beispielsweise das hydrodynamische Verhalten der NP während der Inkubation der Zellen definieren oder die Bindung und mögliche Aufnahmewege in die Zelle beeinflussen können. Daher sollen im Folgenden einige wichtige Parameter dargestellt werden.

Agglomeration in Abhängigkeit des pH-Wertes

Für die Stabilität einer Dispersion ist die Ladung der Partikel von großer Bedeutung, da sie eine langreichweitige Abstoßung zwischen den NP vermitteln kann. Bei in Wasser dispergierten Metalloxiden ($M=O$) trägt die Partikeloberfläche $M-O-H$ Bindungen, die hydrolysiert vorliegen können, wobei dieser Vorgang abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums ist. Die an CeO_2 -Partikeln durchgeführten Messungen verdeutlichen die Auswirkungen auf die Agglomeratbildung. Prinzipiell sind folgende Reaktionen in wässriger Umgebung möglich:



Formel 41



Formel 42

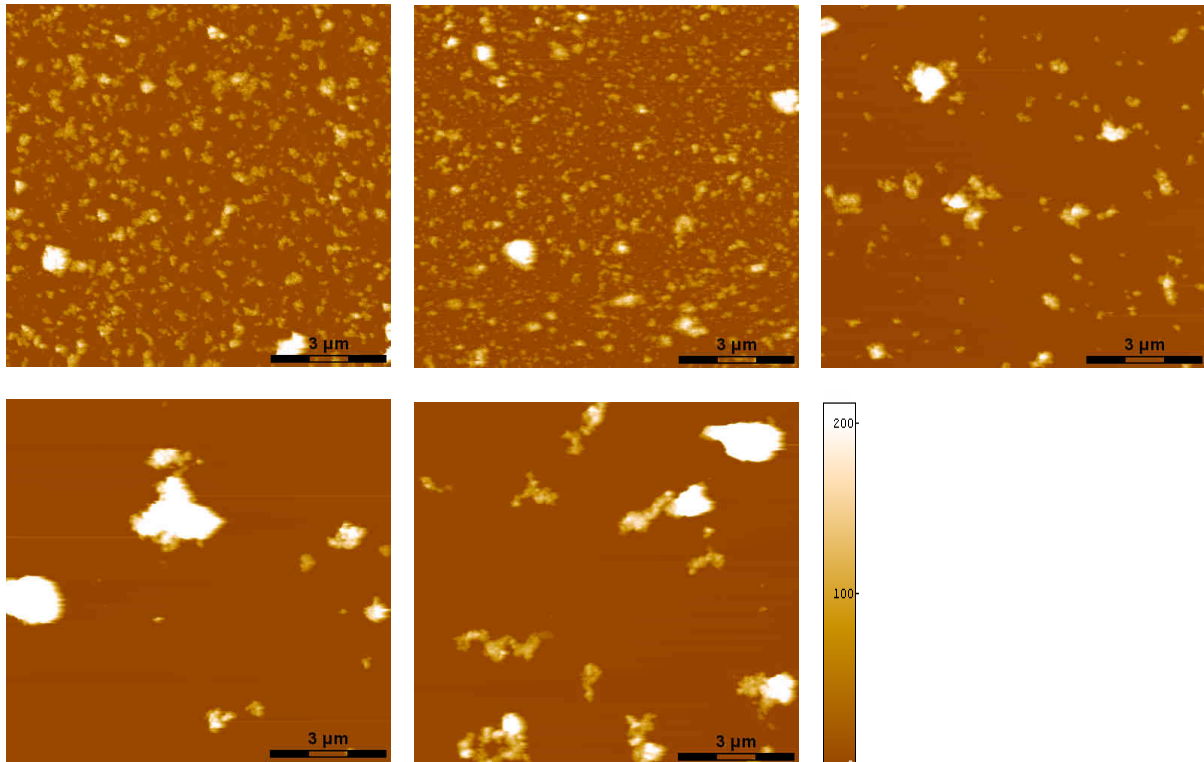


Abb. 25 AFM-Topographie von NP: CeO_2 (Typ 3.2) in H_2O dispergiert bei pH 2, 3, 4, 5-6, 10 und nach Auftrocknen abgebildet.^P

Die Abbildungen zeigen, dass bei niedrigen pH-Werten von 2 – 3 die NP weitgehend in kleinen Einheiten vorliegen, bei denen es sich wahrscheinlich um Aggregate handelt. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Größe der Einheiten zu, was auf eine Agglomeration zurückzuführen ist. Das zeta-Potential der Partikel ist bei niedrigen pH-Werten positiv, fällt mit steigendem pH-Wert ab und erreicht am Isoelektrischen Punkt 0 V. Damit kann die

^P Diese AFM-Messungen wurden im Rahmen einer von mir angeleiteten Bachelorarbeit von Herrn Nils Flaschel durchgeführt.

elektrostatische Abstoßung die attraktiven Van-der-Waals Kräfte nicht mehr kompensieren und die NP agglomerieren. Mit weiter steigendem pH-Wert sollten die NP ein negatives zeta-Potential annehmen, das wiederum der Agglomeration entgegen wirkt. Im hier untersuchten pH-Bereich ist das noch nicht zu erkennen, allgemein kann man davon ausgehen, dass ein Betrag des zeta-Potentials von mindestens 30 mV beziehungsweise eine Differenz des pH-Wert zum Isoelektrischen Punkt von mindestens 2 Einheiten für die Stabilisierung einer Dispersion notwendig sind.⁵² Solche Untersuchungen sind zur Charakterisierung der NP hilfreich in Hinblick auf geeignete Dispersionsmittel und technische Anwendungen. Im Fokus der weiteren Untersuchungen stehen Wechselwirkungen mit biologischen Zellen, wodurch der pH-Wert durch die physiologischen Kultivierungsbedingungen auf 7,4 determiniert ist.

Das zeta-Potential ist von den Ladungen der Partikeloberfläche abhängig, die in salzhaltigen Lösungen von Gegenionen teilweise kompensiert werden. Ein weiterer Effekt ist die Reduzierung der Dicke der Stern-Doppelschicht, einer Hülle von Gegenionen, welche sich an die Grenzfläche zwischen dem NP und dem Medium anschließt. Hier spielt die Ionenstärke eine entscheidende Rolle, wobei gerade der Einfluss mehrwertiger Ionen (z.B. Calcium, Magnesium, Phosphat, Sulfat) von Bedeutung ist. Dies ist nicht nur aufgrund ihres relativ hohen Beitrags zur Ionenstärke der Fall, sondern auch wegen einer möglicherweise festeren Bindung mehrfach geladener Gegenionen an der Partikeloberfläche, die über die Wechselwirkungen mit monovalenten Ionen hinausgeht.⁵² Für die Untersuchungen an lebenden Zellen sind physiologische Medien notwendig, die verschiedene Salze enthalten und eine relativ hohe Ionenstärke aufweisen. Da eine systematische Analyse aller Inhaltsstoffe damit sehr zeitaufwendig wäre, sind von Projektpartnern exemplarisch drei NP in verschiedenen Medien untersucht worden. Obwohl die NP in H₂O stark unterschiedliche zeta-Potentiale aufweisen (TiO₂ -24 mV, CeO₂ +26 mV, ZrO₂ +52 mV), beträgt der Wert in salzhaltigen Puffern und Kulturmedien zwischen -6 und -10 mV für alle Partikel.⁵³ Dieser Befund hat Implikationen für die Interpretation der im Weiteren beschriebenen Messungen der Bindungskräfte der NP auf Zelloberflächen (Kap. 4.2.4). Weiterhin wurden in dem Kulturmedium DMEM für die drei NP mittlere Agglomeratgrößen von 10 – 50 µm Durchmesser bestimmt, was klar den beschriebenen Effekt der Inhaltsstoffe des Mediums auf die NP-Dispersion herausstellt.⁵³

Agglomeration in Abhängigkeit von Proteinen im Medium

Neben elektrostatischen Wechselwirkungen können auch sterische Effekte die Stabilität der NP-Dispersion erhöhen. Auf der Partikeloberfläche angelagerte Polymere wie beispielweise PEG oder im Fall von ZrO₂ einer Polyoxasäure verhindern in H₂O die Agglomeration.⁵² In stark salzhaltigen Medien nimmt dieser Einfluss ab, wie für ZrO₂ in DMEM gezeigt wurde.⁵³ Kulturmedien enthalten neben Salzen und Aminosäuren oft auch Proteine, die für das Zellwachstum essentiell sind und meist aus fötalem Kälberserum (FCS) stammen. Auch diese können an Oberflächen adsorbieren, was beispielsweise für das enthaltene Rinderserumalbumin (BSA) bekannt ist. BSA wird daher in biologischen Tests häufig zur Blockierung weiterer Adsorption an Gefäßwänden genutzt. Da ein Zusatz von 10 % FCS zum Medium in der Zellkultur üblich ist, wurden Messungen in RPMI ohne und mit 10 % FCS durchgeführt. Bei zu erwartenden Agglomeratgrößen im Bereich > 10 µm in Kulturmedium ist AFM als Methode zur Vermessung wenig geeignet, daher wurden Lichtmikroskopische Aufnahmen herangezogen (Abb. 27). Das untersuchte Böhmit bildet in RPMI viele Agglomerate einer Größe von ca. 1 – 20 µm, während in RPMI mit 10 % FCS der Anteil < 5 µm überwiegt. Es zeigt sich damit eindeutig, dass die in FCS enthaltenen Proteine die mittlere Agglomeratgröße reduzieren. Eine quantitative Analyse erfordert Methoden, die die

Gesamtheit der in der Probe vorliegenden NP und Agglomerate erfassen können. In der Studie von Schulze et. al. wurde mittels Analytischer Ultrazentrifugation für die drei untersuchten NP-Typen (TiO_2 , CeO_2 , ZrO_2) eine klare Abhängigkeit der Agglomeratgröße von der FCS-Konzentration im Medium festgestellt. Ein Zusatz von 10 % FCS führte zu mittleren Agglomeratgrößen (d50) von 200 – 2000 nm, in 100 % FCS sank die Größe bis in den Bereich von ca. 50 nm, so dass vermehrt auch Primärpartikel vorliegen.⁵³

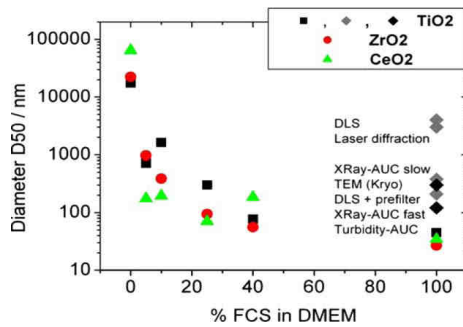


Abb. 26 Durchmesser der NP-Agglomerate in Kulturmedium fällt mit steigender Konzentration an FCS. (aus Schulze et. al.⁵³)

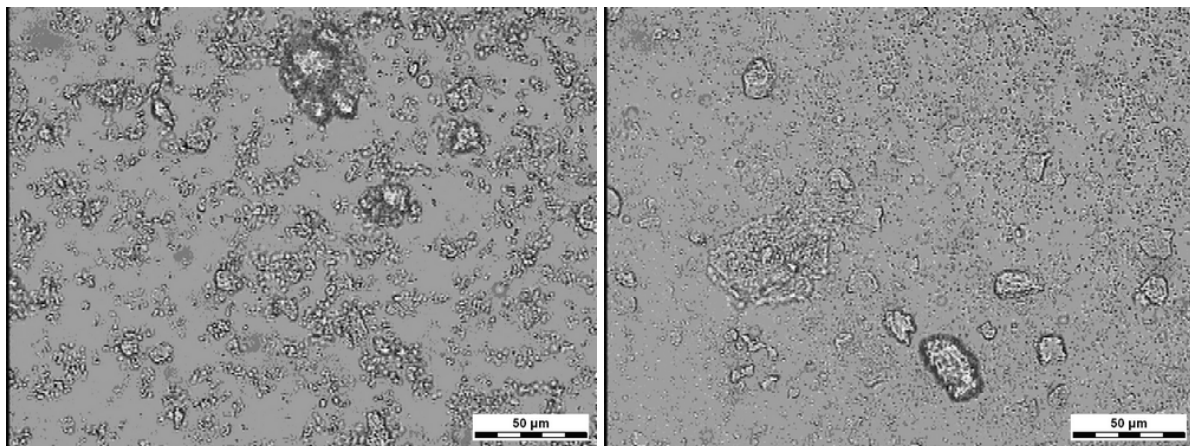


Abb. 27 Lichtmikroskopie Böhmite (Typ 5.2): Agglomeratgröße in RPMI-Kulturmedium ohne FCS (links) mit 10% FCS (rechts) nach 24 h Rühren.

Hier stellt sich die Fragen, ob eine Adsorption von Proteinen auf der Partikeloberfläche ausschlaggebend ist, wie groß der Bedeckungsgrad der Oberfläche ist und welche Proteine beteiligt sind (Blutplasma als Quelle von FCS enthält > 3700 verschiedene Proteine¹¹⁴). Die Vermessung von Proteinen auf Oberflächen mittels AFM wurde bereits an Ms-Rac1 demonstriert (Kap. 4.1.2) und wird hier als Methode evaluiert. Da die meisten NP im Unterschied zu Glimmer keine ebene sondern eine sphärische Oberfläche aufweisen, wurden hierfür die stäbchenförmigen NP aus Hydroxylapatit ausgewählt. Diese zeigen eine polygonale Form, so dass die Messungen auf den geraden Seitenflächen durchgeführt wurden (Abb. 28). Die Partikel wurden in H_2O oder Kulturmedium mit 10 % FCS inkubiert, auf Glimmer aufgebracht und nach Waschen mit H_2O unter Umgebungsbedingungen untersucht. Die in FCS-haltigem Medium inkubierten NP besitzen eine erkennbar raue Oberfläche, wobei die Unebenheiten eine Höhe von ca. 1 – 2 nm aufweisen und damit in einem Bereich liegen, der für Proteine wie BSA zu erwarten ist.¹¹⁵ Aufgrund der hohen Bedeckung der Oberfläche und der Faltung mit der Spitzegeometrie wäre auch ein teilweise größerer Durchmesser der Proteine möglich. Der Vergleich mit den in H_2O dispergierten NP zeigt, dass deren

Oberfläche ebenfalls Unebenheiten aufweist. Diese sind fallen jedoch kleiner aus und kommen insbesondere seltener auf der Oberfläche vor, als es bei mit FCS inkubierten NP der Fall ist (Abb. 28b, e). Es ist somit davon auszugehen, dass die detektierten Unebenheiten zumindest teilweise adsorbierte Proteine darstellen. Die Seitenflächen der NP sind auch bei dem untersuchten Hydroxylapatit unregelmäßig gewölbt, so dass eine Rauheitsanalyse oder ein Histogramm der Proteingrößen durch die Gestalt der Partikel beeinflusst würde und daher hier nicht zum Einsatz kommen kann. Im Vergleich dazu erlaubt der konstante Durchmesser beispielsweise von Kohlenstoffnanoröhrchen eine klarere Zuordnung von adsorbiertem BSA auf MWCNT in einer vergleichbaren Studie.¹¹⁵ Die Verwendung von AFM-Spitzen mit kleinerem Krümmungsradius wie es durch Applikation von CNT an der Spitze erreichbar ist, kann Wege zur Untersuchung von weiteren und ggf. sphärischen NP eröffnen, wobei auch hier die Rauigkeit der natürlichen Oberfläche zu berücksichtigen ist. Diese ist bislang anhand von AFM-Untersuchungen (wie auch vorliegenden TEM-Messungen durch die Hersteller) kaum abzuschätzen. Eine Identifikation von adsorbierten Proteinen anhand des Phasensignals ist in Betracht zu ziehen. Für die durchgeführten Messungen an Hydroxylapatit ergibt sich hier kein ausreichender Kontrast, der für eine Unterscheidung von Proteinen und Partikeloberfläche nötig wäre. Das könnte sowohl ein gänzlich Fehlen von Proteinen als auch eine vollständige Bedeckung der Oberfläche anzeigen. Aufgrund der vorherigen Analysen ist die zweite Interpretation die wahrscheinlichere.

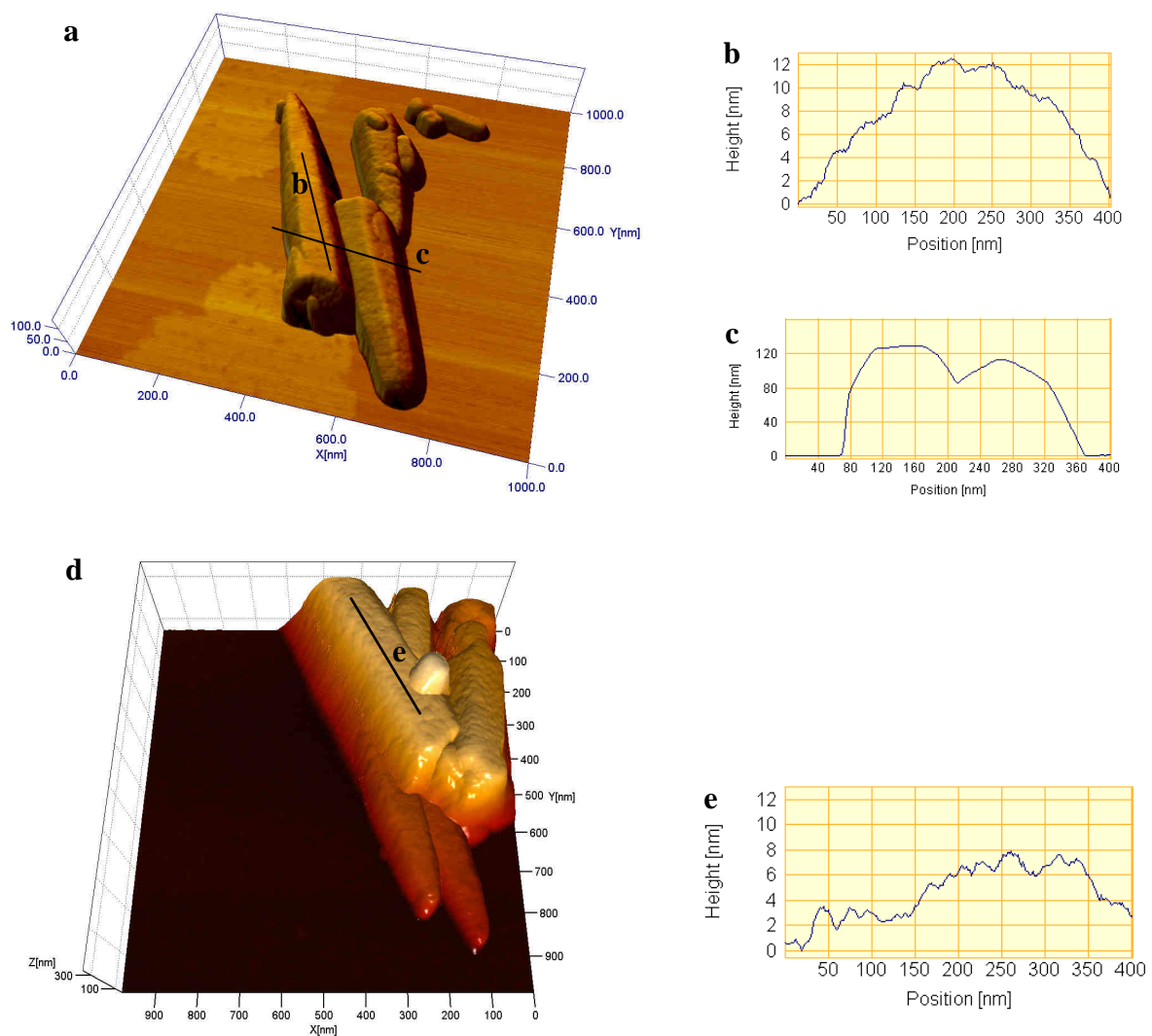


Abb. 28 AFM-Topographie: Hydroxylapatit-NP in H_2O (a – c) und in FCS-haltigem Medium (d, e) inkubiert. Höhenprofil parallel (b, e) und quer (c) zur Längsachse der Partikel

Die Adsorption von Proteinen an NP stellt einen dynamischen Prozess dar, bei dem die Lebensdauer der Komplexe mit verschiedenen Proteinen im Bereich von μs bis Tagen liegt.⁵¹ Proteine geringer Konzentration aber größerer Affinität können mit der Zeit höher konzentrierte Proteine ersetzen.¹¹⁴ Da die Dispergierung der NP durch Rühren über 24 h im jeweiligen Medium durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass die mögliche Bedeckung der Partikel mit Proteinen sich nahe dem Gleichgewichtszustand befindet. Damit sind reproduzierbare Ergebnisse möglich, insbesondere auch was die Bindung und Aufnahme von Partikeln durch Zellen betrifft. Diese könnten mit Proteinen bedeckte Partikel durch entsprechende Rezeptoren erkennen, was im Vergleich zu der Interaktion mit der natürlichen Partikeloberfläche zu einer veränderten Reaktion der Zelle führen kann. Da toxikologische Untersuchungen durch *in vitro* Test in Kulturmedium mit FCS durchgeführt werden, ist die Analyse sowohl der Art wie auch der Dichte von adsorbierten Proteinen von großer Bedeutung für die Aussage der Untersuchung und deren Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo*.

Trocknung der Agglomerate

Die Charakterisierung der NP in wässriger Dispersion erfolgt oft durch optische Messmethoden wie etwa die Dynamische Lichtstreuung DLS,⁵² so dass die Eigenschaften der Partikel unbeeinflusst bleiben. Für mikroskopische Abbildungen (LM, AFM, EM) ist dagegen eine Immobilisierung auf einer Oberfläche notwendig. Während für lichtmikroskopische Untersuchungen die Unterlage lediglich eine definierte Fokusebene sicherzustellen braucht, ist bei AFM-Messungen eine gewisse mechanische Stabilität der Verankerung notwendig, die den – wenn auch schwachen – Kräften der scannenden Spitze standhält. Das kann die Messungen in Flüssigkeit erschweren. Im Fall der EM ist in der Regel eine Trocknung der Probe unumgänglich.

In wässriger Dispersion ausgebildete NP-Agglomerate sedimentieren aufgrund ihrer Größe rasch und sind dabei lichtmikroskopisch zu verfolgen. Wird beispielsweise ein Tropfen von $1\ \mu\text{l}$ auf einer Glasoberfläche aufgetragen, trocknet er in ca. 7 min ab. CeO_2 -Agglomerate (\varnothing ca. $1 - 10\ \mu\text{m}$) können sich dabei ca. $50\ \mu\text{m}$ lateral zum Rand des Tropfens bewegen, bevor sie an der Glasoberfläche anhaften. Um stationäre Agglomerate sammeln sich weitere Agglomerate (Abb. 29).

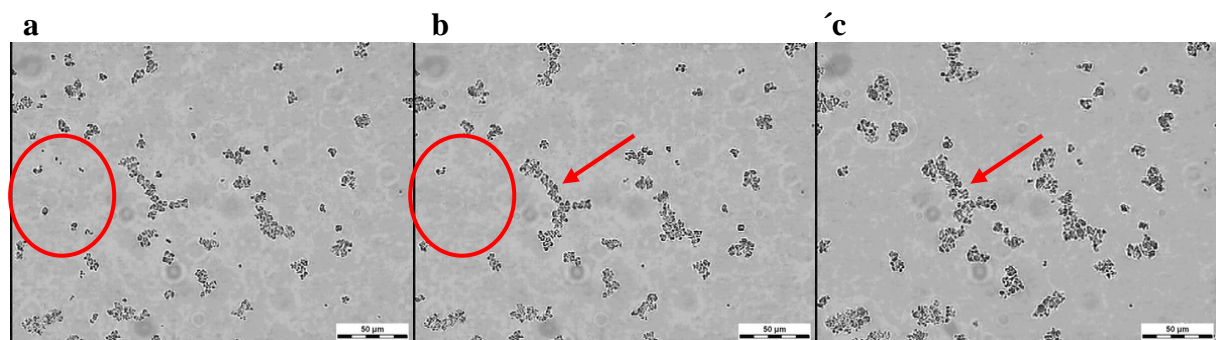


Abb. 29 LM-Bild: Eintrocknen von CeO_2 (Typ 3.2) aus H_2O , nach 360 (a) und 400 s (b) in H_2O sowie 430 s (c) abgetrocknet. Kleine Agglomerate bewegen sich in Flüssigkeit (Kreise), durch Eintrocknen werden Agglomerate breiter (Pfeil). Skala $50\ \mu\text{m}$

Agglomerierte NP werden durch relativ schwache Wechselwirkungen (v. a. Van-der-Waals-Kräfte) zusammengehalten. In einer Dispersion können sie daher beispielsweise durch Rühren oder Ultraschallbehandlung teilweise getrennt werden. Bei der Charakterisierung der Partikel und deren Dispersionen durch EM oder AFM werden getrocknete Proben untersucht. Während bei Primärpartikeln und Aggregaten keine sichtbaren Veränderungen zu erwarten sind, ist die Frage zu klären, ob die Größe oder Form von Agglomeraten durch die Trocknung beeinflusst wird. Hierzu wurde eine Dispersion von CeO_2 in H_2O auf Glimmer aufgetrocknet und untersucht. Die AFM-Abbildungen zeigen Agglomerate der NP, die meist eine flache Form aufweisen (Abb. 30). Die Auswertung von Abb. 24a (TiO_2) ergibt ein Verhältnis der Höhe zum lateralen Durchmesser von 0,37. Zudem befinden sich die Randbereiche der Agglomerate im Kontakt zur Glimmeroberfläche, was ebenfalls auf eine Deformierung einer ursprünglich sphärischen Gestalt hinweist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Oberflächenspannung des Wassers beim Eintrocknen des Tropfens die Agglomerate auf die Glimmeroberfläche presst und dabei deformiert. Ähnliche Vorgänge sind makroskopisch anhand der LM-Abbildungen zu erkennen, wobei hier jedoch aufgrund der geringeren Vergrößerung auch Relativbewegungen einzelner Agglomerate gegeneinander ursächlich sein können. Die vergrößerte Kontaktfläche zwischen dem deformierten NP-Agglomerat und der Unterlage kann eine stärkere Bindung vermitteln, so dass die getrockneten Strukturen auch einem Spülen standhalten und darauf in H_2O abzubilden sind (Abb. 30).

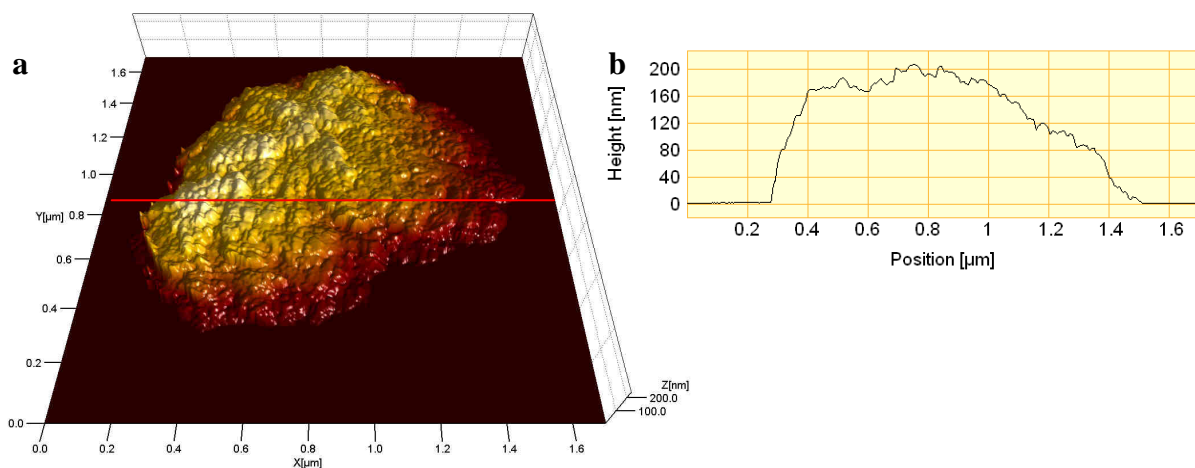


Abb. 30 AFM-Topographie CeO_2 (Typ 3.2) Agglomerat auf Glimmer aufgetrocknet und in Wasser abgebildet (a), das Höhenprofil (b) zeigt große laterale Ausdehnung bei relativ geringer Höhe

4.2.2 Eigenschaften der Zellen

Nachdem die Eigenschaften der Nanopartikel in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern beschrieben wurden, soll nun der Fokus auf die Zellen gelegt werden, deren Wechselwirkungen mit den Partikeln zu untersuchen war. Da die Inhalation von Stäuben als einer der wichtigsten Aufnahmewege von nanopartikulärem Material in den menschlichen Körper angesehen wird,¹¹⁶ sind hier Zelllinien untersucht worden, die dem Lungengewebe entstammen. Es handelt sich dabei um Alveolarepithelzellen Typ II aus der Ratte (RLE-6TN) sowie dem Menschen (A549). Diese wachsen als adhärenente Zellen auf dem Boden des Kulturgefäßes und weisen eine flache Morphologie mit einem lateralen Durchmesser von ca. 30 – 70 μm und einer Höhe von ca. 3 – 5 μm auf. Dadurch haften sie hinreichend fest an der Oberfläche an und es ist eine Abbildung durch AFM ohne eine vorausgehende Behandlung

der Zelle möglich. Dies ist nicht selbstverständlich, da andere Zelllinien beispielsweise eine Beschichtung der Oberflächen mit bestimmten Proteinen benötigen, um überhaupt wachsen zu können oder um sich aus einer Suspensionskultur an der Oberfläche zu einem bestimmten Zelltyp auszudifferenzieren.¹¹⁷ Damit sind die gewählten Zelllinien vergleichsweise unkompliziert nicht nur auf dem Boden von Kulturschalen sondern auch auf darin eingelegten Deckgläsern zu kultivieren und zu untersuchen.

Durch AFM lassen sich die Zellen unter verschiedenen Bedingungen abbilden und kraftspektroskopisch untersuchen. Das Spektrum reicht von lebenden Zellen in Kulturmedium oder Puffer, was dem nativen Zustand sehr nahe kommt über chemisch fixierte Zellen in verschiedenen wässrigen oder organischen Medien bis hin zu getrockneten Zellen. Dabei beeinflussen die Präparations- und Messbedingungen nicht nur die Probe sondern auch die Messtechnik, so dass unterschiedliche Informationen zu gewinnen sind und die Bedingungen der jeweiligen Fragestellung angepasst werden müssen. Alle drei Messbedingungen sind in dieser Studie evaluiert worden. Zu Beginn sollen einige Charakteristika beschrieben werden, die an lebenden Zellen zu beobachten sind.

Cytoskelett tierischer Zellen

Tierische Zellen besitzen eine Lipidmembran, die das Cytosol von dem umgebenden Medium separiert. Darunter befinden sich fibrilläre Strukturproteine, die miteinander vernetzt das Cytoskelett aufbauen (Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli). Die Aufgaben der Elemente des Cytoskeletts gehen über eine einfache mechanische Stützfunktion hinaus und umfassen auch die Definition der Gestalt der Zelle (Morphologie), die Strukturierung des intrazellulären Stofftransports und die Bewegung der Zelle selbst (Zellmotilität).

Pflanzlichen Zellen oder Bakterien weisen anders als tierische Zellen eine feste Zellwand oder einen hohen Innendruck auf, wodurch eine steifere Hülle und somit eine charakteristische Form definiert wird (beispielsweise stäbchenförmige Bakterien, Kap. 4.3). Der Elastizitätsmodul lebender tierischer Zellen liegt im Bereich von 1 – 10 kPa,¹¹⁸ die Zelle ist somit sehr leicht deformierbar. Die bei einer AFM-Messung ausgeübte vertikale Kraft (Contact Mode ca. 50 – 400 pN) führt dazu, dass die Spitze die Membran des augenblicklich gescannten Bereiches bis zu einem gewissen Grad niederdrückt. Unter der Membran liegende Elemente des Cytoskeletts bilden einen deutlich höheren Widerstand für die Spitze und treten deshalb bei den Messungen als topographische Merkmale hervor. Die Membran wird daher vergleichbar mit einem Tuch zwischen diesen Skelettstrukturen aufgespannt. Ein solches Verhalten ist am Beispiel einer RLE-6TN Zelle deutlich erkennbar (Abb. 31). Im Bereich des Zellkerns ist eine Höhe von etwa 4 µm zu verzeichnen, was einen typischen Wert für die untersuchten Zellen darstellt. Der Nucleus ist nach außen hin umgeben von Cytoskelettstrukturen, die diesem zentralen Bereich der Zelle mechanische Stabilität verleihen. Das Netzwerk erstreckt sich weiter bis in die Peripherie der Zelle, die deutlich flacher ist. Das Profil (Abb. 31 b) zeigt dort eine Höhe der Zelle von ca. 200 ± 100 nm. Da das Cytoskelett an der Zelloberfläche über Proteine mit der Membran verankert ist, kann man annehmen, dass die tatsächliche Höhe der Zelle durch die Filamente bestimmt wird. Demnach kommt es zu einer Indentation von ca. 50 – 150 nm zwischen den einzelnen Elementen des Cytoskeletts. Hierbei ist zu bedenken, dass das Cytosol keine homogene Zusammensetzung aufweist, da kleinere Organellen und möglicherweise weitere Strukturelemente eingelagert sind, die lokale Unterschiede des E-Moduls bewirken können.

Neben der Aufrechterhaltung der Form einer Zelle haben Mikrofilamente und Mikrotubuli auch eine Transportfunktion innerhalb der Zelle. Sie bilden ein dreidimensionales Gerüst,

entlang dem weitere Proteine eine durch ATP-Hydrolyse getriebene Bewegung durchführen können. Während sich bei der Muskelkontraktion Myosinfilamente gegenüber Aktinfilamenten verschieben, kommen hier dimere Myosinmoleküle zum Einsatz.¹¹⁹ Sie transportieren dabei gebundene Stoffe bis hin zu Organellen und Vesikeln. In dieser Weise wäre auch die intrazelluläre Bewegung aufgenommenen Partikel denkbar.

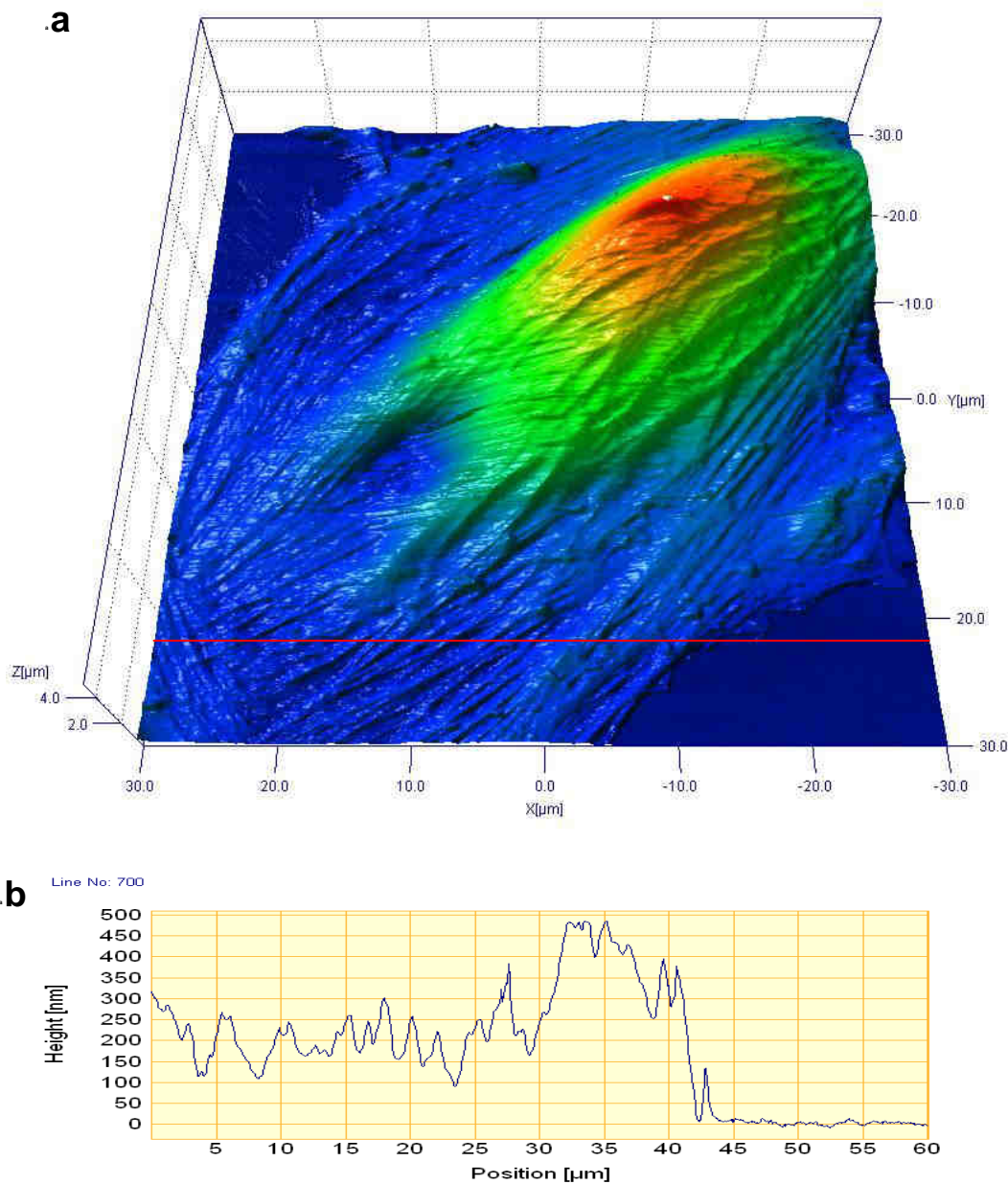


Abb. 31 AFM-Topographie einer lebenden RLE-6TN Zelle in Kulturmedium (ohne FCS) im Contact Mode (a). Das Profil (rote Linie) verdeutlicht die Höhe der Zelle und der Cytoskelettstrukturen (b).

Bewegung der Zelle

Wie an der Abb. 31 deutlich wird, weisen Zellen häufig eine unregelmäßige und teilweise gestreckte Gestalt auf. Diese Formgebung wird durch die Filamente hervorgerufen, die verstärkt entlang der jeweiligen Richtung angeordnet sind. Die Polymerisation von Aktin am

Plus-Ende der Mikrofilamente führt zu einem gerichtetem Wachstum. Hierdurch haben die Zellen die Möglichkeit, sich beispielsweise nach der Zellteilung voneinander zu entfernen oder auch gezielt nach Nahrung beziehungsweise Fremdkörpern zu suchen (Chemotaxis), was im Falle von Amöben oder bestimmten Leukozyten (z.B. Makrophagen) der Fall ist. Die neu gebildeten Mikrofilamente (und später auch Mikrotubuli) vernetzen sich untereinander und verankern sich über Adhäsionsproteinen an der basalen Seite der Membran mit dem Untergrund. Düninflüssiges Cytoplasma (Ektoplasma) fließt in den Bereich nach so dass sich Lamellipodien ausbilden. Diese Prozesse sind reversibel und erlauben durch den Abbau des Cytoskeletts in anderen Teilen eine Bewegung der Zelle. Für die Kontrolle des Aufbaus der Aktinfilamente sind unter anderem GTP-bindende Proteine der Rho-Familie von entscheidender Bedeutung. Besonders Rac1, das als Homologes zu dem im ersten Ergebnisteil behandelten pflanzlichen Ms-Rac1 gilt, ist an dieser Stelle zu nennen.³⁸ Auch in Pflanzen gibt es Hinweise auf ähnliche Funktionen von entsprechenden Proteinen.¹²⁰ Die Ausbildung eines Lamellipodiums ist anhand von zeitabhängigen AFM-Messungen an einem Fibroblasten zu beobachten (Abb. 32). Man erkennt deutlich die Bewegung der Zelle auf dem Boden der Kulturschale, wobei zwischen den ersten zwei Aufnahmen (jeweils nach 8,5 min) eine Ausdehnung der Zelle zu verzeichnen ist. Im unteren Teil des Bildes sind klar die vernetzten Filamente des Cytoskeletts zu erkennen, während in den Bereich des Lamellipodiums feine strahlenartige Strukturen führen. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um neu ausgebildete Mikrofilamente, die in die Wachstumsrichtung der Zelle weisen. Die Höhe dieses neu gebildeten Bereiches der Zelle beträgt ca. 120 – 150 nm. Nach weiteren 8,5 min haben sich das Lamellipodium und Teile der Zelle wieder zurückgezogen (Abb. 32c).

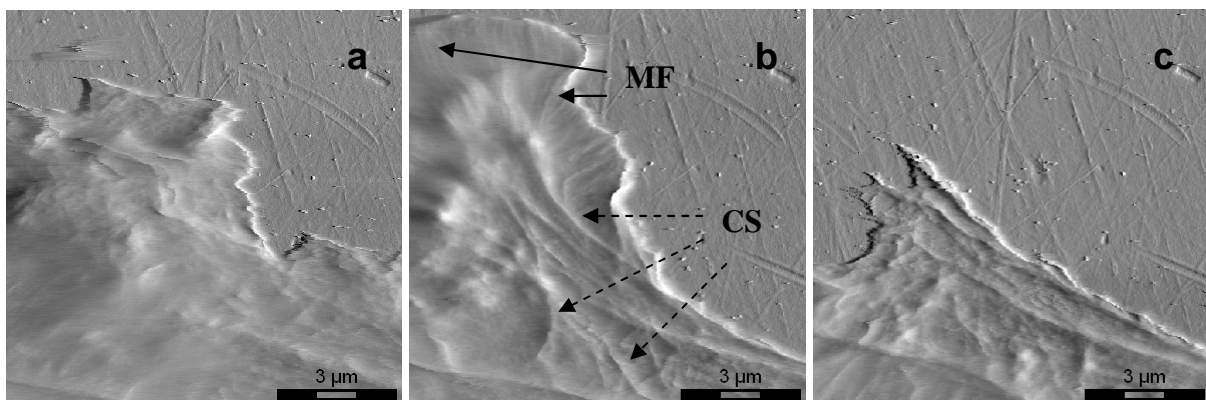


Abb. 32 Ausbildung eines Lamellipodiums durch einen Fibroblasten (NIH-3T3). Abbildung auf einer Kulturschale in DMEM / PBS 1:1 bei RT im Contact Mode (Deflection). Zeitlicher Abstand je 8,5 min. Im unteren Teil der Zelle sind Cytoskelettstrukturen (CS) erkennbar, im Bereich des Lamellipodiums entstehen feinere Strukturen (MF) in der jeweiligen Bewegungsrichtung der Zelle.

Anhand dieser Messungen wird deutlich, dass mittels AFM biologische Zellen unter weitgehend physiologischen Bedingungen untersucht werden können. Ganze Zellen wie auch Ausschnitte daraus sind darstellbar. Die Zeitskala der Messungen erlaubt die Erfassung zelldynamischer Prozesse im Bereich weniger Minuten. Hierzu ist der Scanbereich entsprechend auf einige μm^2 einzugrenzen. Das ist gezielt möglich, wenn die zu beobachtenden Prozesse auf der ganzen Zelloberfläche oder zumindest in großen Teilen davon stattfinden. Kommen nur kleine Bereiche zur Untersuchung in Frage, ist eine Auswahl zu treffen, um das AFM entsprechend zu positionieren. Für die Untersuchung der Bindung und Aufnahme von Partikeln durch die Zelle bedeutet das, dass eine Vorauswahl zu treffen ist. Die Partikel gelangen während der Inkubation an willkürlichen Stellen in Kontakt zur

Zelle und eine Identifikation beispielsweise durch Lichtmikroskopie ist erst für Agglomerate im μm -Bereich mit akzeptabler Sicherheit möglich. Die Verwendung von fluoreszent markierten Nanopartikeln stellt eine sinnvolle Methode zur Identifikation auch kleinerer Partikel dar, durch die ein relevanter Scanbereich für das AFM leicht festzulegen ist. Die Kombination beider Techniken wird im Kapitel 4.2.3 dargestellt. Die im Rahmen des Projektes NanoCare zu untersuchenden Nanopartikel stellen industriell genutzte Substanzen dar, die über keine geeigneten Fluoreszenzeigenschaften (v. a. Absorption und Emission im sichtbaren Bereich, hohe Fluoreszenzintensität) verfügen. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen mit den Nanopartikeln an chemisch fixierten Zellen durchgeführt.

4.2.3 Nanopartikel auf Zelloberflächen

Die Interaktion der Zellen mit Nanopartikeln beginnt mit der Bindung der NP auf der Zelloberfläche. Partikel, die daraufhin in die Zelle aufgenommen werden, können dort eine potentiell toxische Wirkung entfalten, was durch verschiedene Partner des NanoCare-Konsortiums untersucht wurde. Über Mechanismen der Partikelbindung und Aufnahme gibt es bislang wenig allgemeingültige Informationen. Daher gilt es, Methoden zur Darstellung und Identifizierung von auf Zelloberflächen gebundenen NP zu evaluieren, wobei insbesondere die Anwendbarkeit unter möglichst nativen Bedingungen von Bedeutung ist. So ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Testverfahren möglich, die gleichfalls diesem Ziel verpflichtet sind und im hier durchgeführten Projekt ähnliche Versuchsbedingungen realisieren. Im Folgenden werden daher Resultate dargestellt, die durch AFM-Messungen von verschiedenen Nanopartikeln in wässrigen Medien erhalten wurden. Das Trocknen der Proben stellt eine weniger native Situation der Zellen dar, erlaubt allerdings eine erhöhte Auflösung der AFM-Darstellungen und ist für SEM-Abbildungen unumgänglich. Die so erzielten Ergebnisse werden abschließend dargestellt und mit Messungen in Flüssigkeit korreliert.

Hierzu wurden die Zellen in einer Kulturschale mit einer Dispersion der Partikel inkubiert, ungebundene Partikel durch Waschen entfernt und die Zellen darauf chemisch fixiert. Die Fixierung friert gewissermaßen einen bestimmten Zustand ein, so dass keine weiteren Veränderungen (wie beispielsweise auch die zuvor geschilderten Bewegungen) der Zelle stattfinden. Diese wird dabei dauerhaft konserviert und erlaubt so die Untersuchung der Partikelbindung oder Partikelaufnahme zu einem definierten Zeitpunkt. Damit können relevante Bereiche anhand eines Übersichtsscans selektiert werden und darauf auch mehrfach und reproduzierbar vermessen werden. So lassen sich geeignete Parameter der Geräteeinstellung bestimmen, um eine hohe Auflösung der Darstellungen zu erreichen. Das ist insbesondere in Anbetracht der empfindlichen Oberflächenstruktur der Zellen von Bedeutung. Hier kommt ein weiterer Vorteil der Fixierung zum Tragen, da die kovalente Vernetzung von Proteinen über die darin vorkommenden Aminogruppen die gesamte Struktur der Zelle mechanisch stabilisiert. Neben dem Cytoskelett verfügt auch die Cytoplasmamembran über eingelagerte Proteine, deren Vernetzung dazu führt, dass sie durch die AFM-Spitze weniger deformiert wird. Damit entspricht die gemessene Topographie eher der natürlichen Morphologie der Zelle. Der E-Modul der Zelle steigt daher typischerweise um mindestens eine Größenordnung auf ca. 100 kPa.¹¹⁸

Größe und Verteilung der NP-Agglomerate

Die Zellen werden mit NP inkubiert, wobei die Bedingungen den normalen Kultivierungsbedingungen entsprechen. Die möglichen Reaktionen der Zellen sind damit nur durch die NP bedingt und unbeeinflusst von Veränderungen des Mediums oder der Temperatur. Das bedeutet, die NP liegen dispergiert in Kulturmedium mit 10 % FCS vor. Diese Bedingungen haben Einfluss auf die Agglomeration der NP, wie bereits in Kapitel 4.2.1 dargestellt wurde. Man kann also davon ausgehen, dass die NP in der Dispersion zu Einheiten von im Mittel ca. 200 – 2000 nm Durchmesser agglomerieren. Es gilt nun zu überprüfen, ob diese Strukturen auch von der Zelloberfläche gebunden werden.

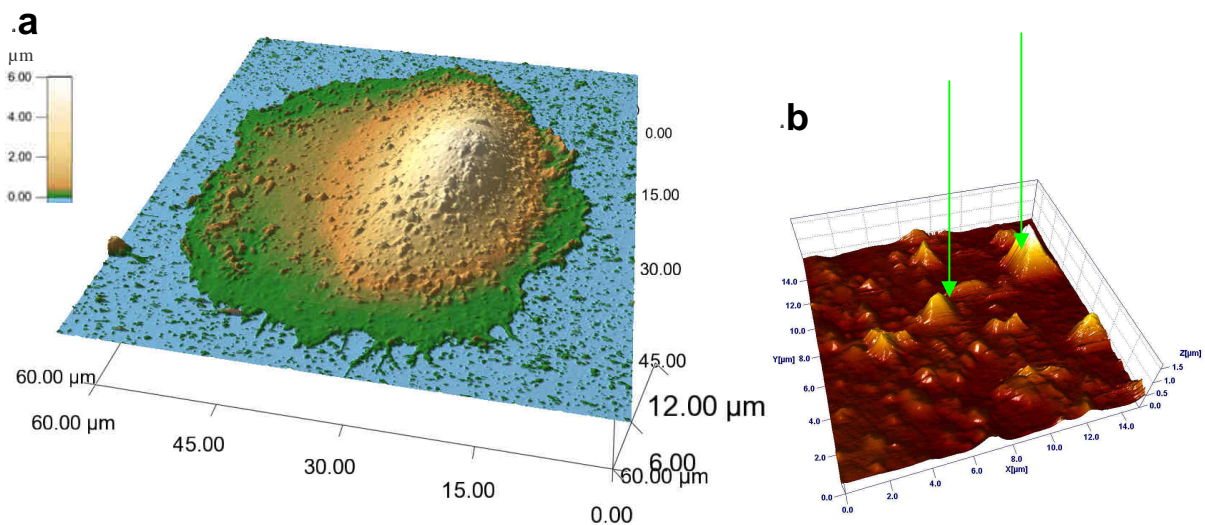


Abb. 33 Zelle (RLE-6TN) mit NP CeO_2 (Typ 3.2) inkubiert in Puffer abgebildet. Die hohe Anzahl an Protrusionen entsteht durch gebundene NP-Agglomerate (a). Der vergrößerte Ausschnitt (b) zeigt NP-Agglomerate (Pfeile).

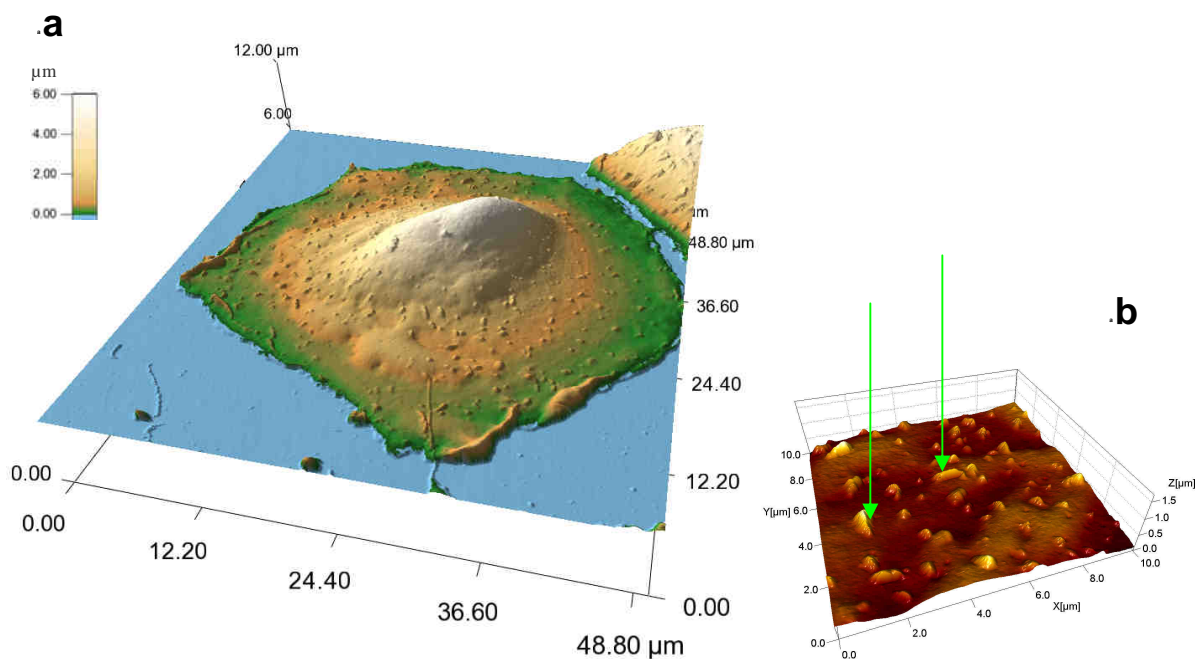


Abb. 34 Zelle (RLE-6TN) ohne NP in Puffer abgebildet. Die geringe Anzahl der Protrusionen wird durch Microvilli hervorgerufen (a). Einige der Villi liegen parallel zur Membran (b, Pfeile).

Die fixierten Zellen zeigen wie die lebendig abgebildeten Zellen eine unregelmäßige und flache Gestalt, wobei allerdings die Oberfläche zumindest makroskopisch eine weniger ausgeprägte Strukturierung aufweist. Cytoskelettelemente treten weniger deutlich hervor. Dadurch wird die Auswertung von Unebenheiten der Oberfläche selbst und somit auch von gebundenen Partikeln erleichtert. Auf mit NP inkubierten Zellen sind deutlich Erhebungen von bis zu mehreren 100 nm Höhe erkennbar, die lateralen Dimensionen erreichen teilweise 1 – 2 μm (Abb. 33). Damit stimmt ihre Größe gut mit dem mittleren Durchmesser überein, der für NP-Agglomerate zu erwarten ist.

Auch wenn das ein klares Indiz für die Bindung von NP-Agglomeraten auf der Zelloberfläche ist, sind weitere Daten zur Identifikation der Strukturen als NP zu sammeln. Daher wurden in gleicher Weise Zellen untersucht, die nicht mit NP inkubiert, aber sonst identisch präpariert wurden. Deren Oberfläche zeigt einige Protrusionen, die eine Höhe von ca. 100 – 400 nm aufweisen (Abb. 34). Diese sind auf AFM-Abbildungen lebender Zellen nicht erkennbar sondern treten erst nach der Fixierung auf. Diese Strukturen basieren jedoch nicht auf Artefakten, die beispielsweise durch Koagulation von Proteinen aufgrund der chemischen Vernetzung entstehen könnten, sondern stellen natürliche Strukturen der Zelle dar, die als Microvilli bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um filigrane schlauchartige Ausläufer der Zelle von wenigen μm Länge. Sie bestehen vor allem aus einem Bündel von Aktinfilamenten, das durch eine Membran umhüllt und intrazellulär mit dem Cytoskelett verbunden ist. Wegen dieses flexiblen Aufbaus können sie der AFM-Spitze ausweichen, so dass sie an lebenden Zellen nicht zu detektieren sind. Die chemische Fixierung versteift die Struktur soweit, dass zumindest die Verankerung an der Zelle als Protrusion erkennbar wird.¹²¹ Die vollständige Gestalt wird durch die Trocknung der Zelle sichtbar und wird – wie auch eine mögliche Beteiligung an der Bindung der NP – später genauer diskutiert.

Die Größe der natürlichen Protrusionen und derjenigen Protrusionen, die potentiell durch die NP-Agglomerate hervorgerufen werden überschneidet sich in Teilen. Eine Identifizierung einzelner Strukturen als NP-Agglomerat ist für größere Protrusionen ($> 400 \text{ nm}$) möglich. Während NP-Agglomerate solche Dimensionen erreichen können (Abb. 33b), ist das für Microvilli nicht zu erwarten. Wie Messungen an getrockneten Zellen zeigen werden, beträgt der Durchmesser der Microvilli ca. 50 – 100 nm. Die Größe des Verankerungsbereichs an der Zelle, der nach der Fixierung erkennbar wird, ist damit lateral begrenzt und durch die Steifigkeit der Strukturen auch in der Höhe limitiert. Selten verlaufen die Microvilli teilweise parallel zur Membran und sind direkt daran angelagert (Abb. 34b). Dadurch wird aber nur die laterale Ausdehnung und nicht die Höhe beeinflusst.

Vergleicht man die Gesamtheit der Protrusionen einer Zelle, wird klar, dass auf mit NP inkubierten Zellen Protrusionen in einer signifikant höheren Dichte auftreten. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurden einzelne Protrusionen mittels der Partikelanalysefunktion der SPIP-Software ausgewertet. Zusammenhängenden Bereiche, deren maximale Höhe über dem Grenzwert von 60 nm liegt, wurden als jeweils eine Protrusion gezählt. Da größere Unebenheiten der Oberfläche und insbesondere der Zellkern (Höhe ca. $4\mu\text{m}$) diese Auswertung behindern, wurde für jeden Messpunkt ein Mittelwert der Topographie berechnet (basierend auf den umgebenden 21×21 Pixeln) und von der Topographie abgezogen. So erhält man eine weitgehend ebene Fläche, auf der sich die Protrusionen deutlich und einzeln abzeichnen. Dieses Verfahren wurde für jeweils 3 Zellen mit und ohne NP durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die Darstellung zeigt den Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 35). Der Anteil an Protrusionen steigt mit fallender Höhe, was für beide Gruppen gilt. Dabei liegt die Dichte der Protrusionen bei mit NP inkubierten Zellen um den Faktor 3 über der Dichte von unbehandelten Zellen. Wenn sich auch eine Identifikation kleinerer NP-Agglomerate allein anhand der AFM-Topographie im Einzelfall nicht trivial ist, kann man aufgrund dieses Ergebnisses davon ausgehen, dass die Mehrzahl der Protrusionen gebundene

NP-Agglomerate repräsentiert. Die Verteilung in dem Histogramm wird von Protrusionen im Bereich um 100 nm dominiert. Hinsichtlich der Interaktion mit NP kann das einerseits bedeuten, dass bevorzugt kleinere Agglomerate gebunden werden. Es ist weiterhin möglich, dass durch eine teilweise Aufnahme in die Zelle die detektierbare Höhe der Agglomerate reduziert wird. Dieser Prozess ist anhand der hier eingesetzten NP schwer zu verfolgen, wird allerdings für fluoreszierende Partikel dargestellt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Messung der Höhe der Strukturen auf der Zelloberfläche gerade in Flüssigkeit leichten Schwankungen unterliegt. Da die Zelle in der Lage ist, dem wenn auch geringen Druck der AFM-Spitze nachzugeben, ist es möglich, dass die Strukturen geringfügig höher sind, als die Messungen angeben. Bei den hier zugrundeliegenden Experimenten wurde im Contact-Mode mit einer vertikalen Kraft von ca. 100 pN gearbeitet, wodurch solche Effekte minimiert werden.

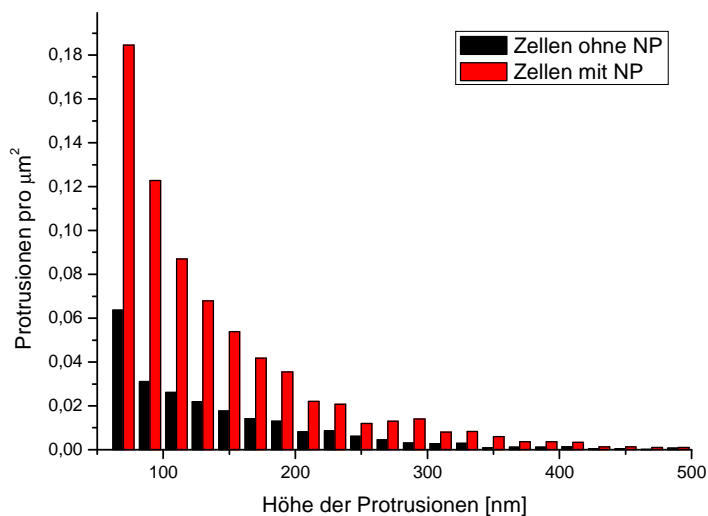


Abb. 35 Histogramm der Dichte an Protrusionen auf der Oberfläche von RLE-6TN Zellen mit / ohne NP CeO₂ (Typ 3.2) inkubiert.

Hinsichtlich der Lokalisierung der NP auf der Zelle zeigen die Abbildungen, dass bei mit NP inkubierten Zellen sowohl in den peripheren Bereichen wie auch auf dem Nucleus eine erhöhte Anzahl an Protrusionen vorhanden ist (Abb. 33). Man kann daher davon ausgehen, dass die Affinität zu den untersuchten NP-Agglomeraten (CeO₂) makroskopisch gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt ist und keine Bereiche der Zelle von der Bindung ausgenommen sind.

Um nun die Analyse auf kleinere Areale der Zelloberfläche zu fokussieren, ist erforderlich, individuelle NP und NP-Agglomerate identifizieren zu können. Hierzu kommen prinzipiell verschiedene Eigenschaften von NP in Betracht, die sie von der Zelloberfläche unterscheiden:

- NP-Agglomerate zeigen einen charakteristischen Aufbau aus Primärpartikeln
- NP unterscheiden sich mechanisch von Zellen (Elastizität, Reibung an der Oberfläche)

Unter welchen Bedingungen diese Charakteristika nutzbar zur Detektion und Identifizierung sind, soll nun evaluiert werden.

Gestalt von NP-Agglomeraten auf Zellen

Auf den Darstellungen ganzer Zellen sind NP-Agglomerate als Protrusionen erkennbar, die vor allem durch ihre Höhe gekennzeichnet sind. Aufgrund der Größe von einigen 100 nm sind sie auf diesen Bildern (Kantenlänge ca. 60 μm) nicht detailliert erkennbar. Daher sollen nun Abbildungen kleinerer Bereiche betrachtet werden, um die Form der von Zellen gebundenen NP-Agglomerate genauer zu untersuchen. Die Abb. 36 zeigt im Zentrum eine Protrusion der Zelloberfläche, die aufgrund ihrer Größe sicher als NP-Agglomerat identifiziert werden kann. Die Form des Agglomerates in dieser Abbildung ist als pyramidal zu beschreiben, was durch den Einfluss der Spitzengeometrie begründet ist. Die verwendeten SiN-Spitzen haben die Gestalt einer vierseitigen Pyramide mit einem halben Öffnungswinkel von etwa 35°. Beim Scannen von Strukturen im Bereich von mehreren 100 nm Höhe stellt die Abbildung eine Faltung der Gestalt von Spitze und Probe dar. Das ist ein generelles Phänomen, das bei der Darstellung von NP-Agglomeraten dieser Größe durch AFM auftritt. Es kann durch Verwendung von AFM-Spitzen mit höherem Aspektverhältnis reduziert aber nicht gänzlich vermieden werden. Solche Spitzen wurden bei der Untersuchung von Bakterien eingesetzt, die ebenfalls hohe und steile Flanken besitzen (Kapitel 4.3). Aufgrund des schärferen Spitzenapex und des damit größeren Druckes auf die Probe sind diese Spitzen aber für relativ weiche und empfindliche Proben wie tierische Zellen wenig geeignet.¹²²

Durch den Kontakt mit den Flanken der AFM-Spitze kommt es zwar in den Randbereichen der NP-Agglomerate zur Beeinflussung der Abbildung, die zentralen Areale sollten dagegen eher eine horizontale Oberfläche aufweisen und damit die Abbildung der eigentlichen Topographie erlauben. In den Abbildungen der auf Zelloberflächen gebundenen NP-Agglomerate ist dies (zumindest in Flüssigkeit) nicht zu beobachten. Der Grund dafür wird ebenfalls an der Abb. 36 deutlich: Die AFM-Spitze übt normalerweise nur über den Apex eine vertikale Kraft auf die Probe aus. Aufgrund der Scanbewegung kommt eine Reibungskraft hinzu, die aber durch Verwendung des Tapping-Mode minimiert wird. Bei den hohen Strukturen der NP-Agglomerate findet der Kontakt zur Probe nicht mehr durch den Apex sondern über die Flanken der Spitze statt, wodurch eine weitere laterale Kraft zur Wirkung kommt. Diese basiert zum einen auf einer Komponente der vertikalen Kraft, mit der der Cantilever auf die Probe gedrückt wird. Sie wird daher durch den Öffnungswinkel der Spitze definiert.¹²³ Zum anderen bewirkt die Bewegung der Spitze eine direkte Kraft in die jeweilige Scanrichtung. Dadurch werden hohe und steile Strukturen auch im Tapping-Mode lateralen Kräften ausgesetzt, die zu einer Ausweichbewegung der Probe führen können. Ein solches Verhalten tritt bei NP-Agglomeraten auf. Man erkennt das an der asymmetrischen Form der Pyramide, die in die Scanrichtung verkippt ist. Die Spitze der Protrusion wird dabei um jeweils ca. 1 μm aus der zentralen Position verschoben, wie die Schnittebene durch das topographische Bild zeigt (Abb. 36c). Die Kontaktfläche zur Zelle (Grundfläche der Pyramide) verbleibt weitgehend an ihrer Position (Abb. 36 a, b), der Versatz in den topographischen Darstellungen dieses Bereiches ist darin begründet, dass die AFM-Spitze die jeweils ansteigenden Flanken abbildet, den steil abfallenden Flanken der Protrusion jedoch nicht exakt folgen kann. Der Kontakt zwischen der AFM-Spitze und dem NP-Agglomerat wirkt also wie ein Hebel, allerdings kommt es nicht zur Ablösung des gebundenen Agglomerates von der Zelloberfläche. Wie bereits geschildert ist die Zelle mechanisch flexibel und so wird nicht das NP-Agglomerat sondern die Zelle deformiert. Dieser Prozess ist weitgehend reversibel, was man daran erkennen kann, dass das Aggregat über den gesamten Scanvorgang (der sogar mehrfach wiederholbar war) am selben Ort verbleibt und die pyramidale Gestalt nur wenig gestört erscheint.

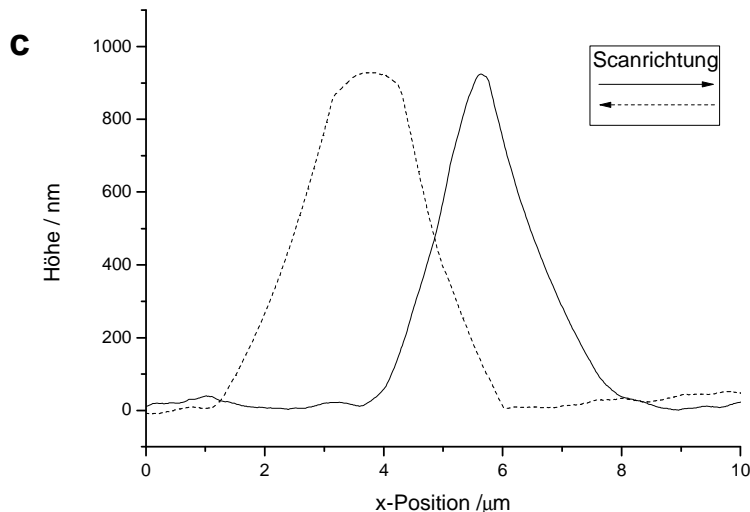
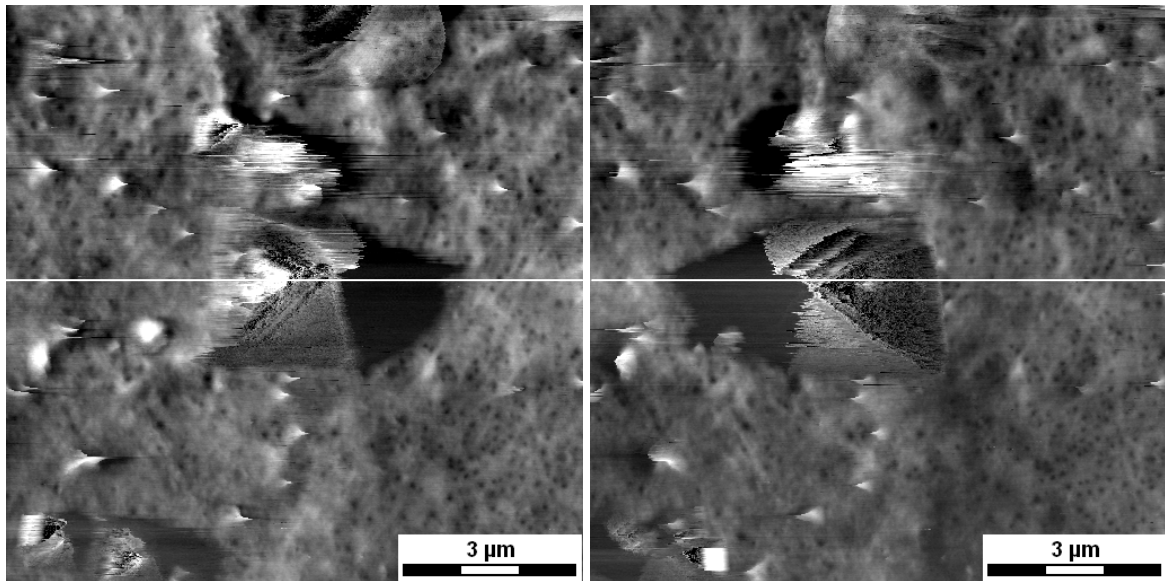


Abb. 36 NP-Agglomerat CeO_2 (Typ 3.2) auf Zelloberfläche gebunden. Laterale Kräfte der AFM-Spitze verschieben das Agglomerat. Tapping-Mode, Deflection dargestellt (Scanrichtung \rightarrow a, \leftarrow b). Schnittbild (Linie in a, b) durch korrespondierende Topographie (c) zeigt lateralen Versatz um $> 1 \mu\text{m}$

Die Abbildung von NP-Agglomeraten unter vergleichbaren Bedingungen (Messungen in Wasser mit AFM-Spitzen desselben Typs) zeigt, dass Strukturen, die auf einer harten Oberfläche immobilisiert sind detailliert dargestellt werden können (Abb. 37). Die Höhe des NP-Agglomerates ist mit ca. 600 nm im Bereich des zuvor auf der Zelloberfläche untersuchten, die lateralen Kräfte sind daher vergleichbar. An den Seiten des Agglomerates kommt es wiederum zum Kontakt mit den Flanken der Spitze, wie aus den parallelen Seiten der dreieckigen Strukturen erkennbar ist. Im oberen Teil des NP-Agglomerates treten klar die einzelnen Primärpartikel hervor. Das geschilderte Verhalten der auf Zellen gebundenen NP-Agglomerate ist daher eindeutig durch die weiche und flexible Unterlage der Zelloberfläche begründet. Die lateralen Verschiebungen von NP-Agglomeraten können bei kleineren Strukturen weniger dramatisch ausfallen. In Anbetracht der Größe einzelner Primärpartikel von etwa 20 nm bedingen allerdings schon kleine Verschiebungen der Probe, dass der Aufbau der NP-Agglomerate aus einzelnen NP nicht mehr so detailliert erkennbar ist, wie es für eine Identifizierung als NP notwendig wäre. Die Steifigkeit fixierter Zellen ist in

wässrigem Medium nicht mehr signifikant zu steigern, allerdings ist das durch die Trocknung der Zellen zu realisieren. Die so erzielten Ergebnisse werden später behandelt und ermöglichen eine eindeutige Identifikation der auf Zelloberflächen gebundenen NP.

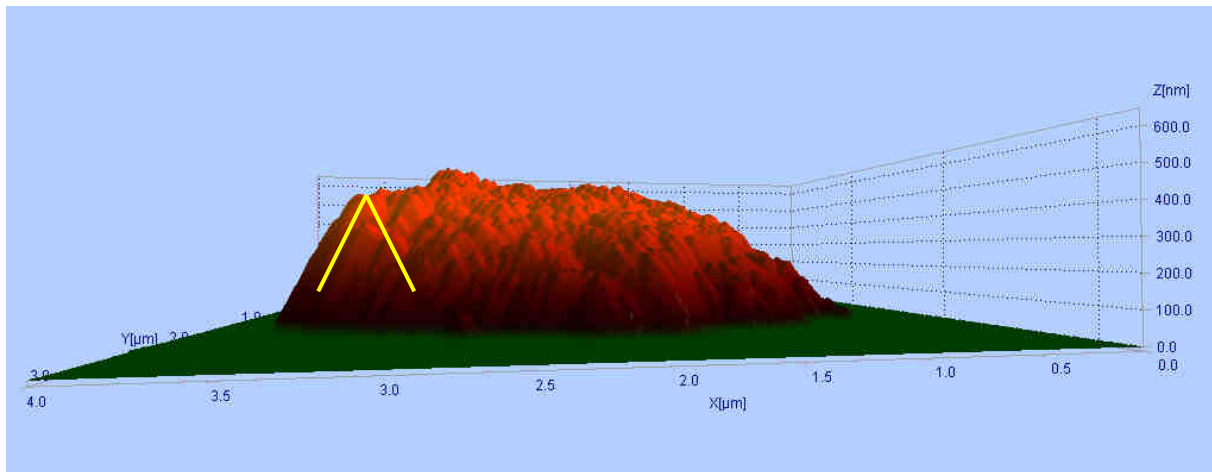


Abb. 37 NP-Agglomerat CeO₂ (Typ 3.2) auf Mica in H₂O abgebildet. Primärpartikel sind erkennbar, keine laterale Verschiebung der NP, die pyramidale Spitzengeometrie ist erkennbar (gelbes Dreieck)

Die Auflösung flacherer Strukturen auf der Zelloberfläche wird durch die geschilderten Effekte nicht beeinträchtigt. Das wird beispielsweise an den zahlreichen Vertiefungen in der Cytoplasmamembran deutlich, die als dunkle Punkte erkennbar sind (Abb. 36 a, b). Sie besitzen einen lateralen Durchmesser von 100 – 200 nm und eine Tiefe von 5 – 15 nm. Bei diesen Einstülpungen der Membran kann es sich um Caveolae handeln. Sie begründen einen wichtigen Endocytose-Mechanismus, der neben Clathrin-vermittelten Prozessen von großer Bedeutung auch für die Aufnahme von Partikeln ist.⁴⁵ Für verschiedene Epithelzellen wurde eine Dichte von 10 – 90 Caveolae / μm² Zelloberfläche angegeben.¹²⁴ Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen werden ca. 17 Vertiefungen / μm² gefunden, was einen plausiblen Wert darstellt. Hierbei handelt es sich um Alveolarepithel Typ II, das *in vivo* keine Caveolae aufweist. Typ II Zellen stellen jedoch Vorläufer der Typ I Zellen dar und können in Kultur Eigenschaften dieser Zellen ausbilden, für welche das Vorhandensein von Caveolae bekannt ist.¹²⁵

Detektion intrazellulärer Strukturen anhand des Phasensignals

Die verschiedenen Betriebsmodi des AFM ermöglichen nicht nur die Vermessung der Topographie einer Probe, sondern lassen sich auch zur Charakterisierung von Materialeigenschaften nutzen. So können beispielsweise Informationen hinsichtlich Reibung, Magnetismus oder Viskoelastizität gewonnen werden.⁷⁵ Weist eine Probe Heterogenitäten solcher Materialeigenschaften auf, ist das am Kontrast der entsprechenden Bilddaten zu erkennen. Ein solches Verhalten könnte auch bei Proben von NP auf Zelloberflächen auftreten und böte eine Methode zur Identifikation der NP, bei der keine weiteren Techniken erforderlich wären.

Im Tapping-Mode kommt es zu einem kurzzeitigen Kontakt der AFM-Spitze und der Probe, wodurch die Schwingungseigenschaften des Cantilevers beeinflusst werden. Der Nucleus bildet mit ca. 3 – 5 μm den höchsten Punkt der Zelle und seine lateralen Dimensionen

betragen ca. 10 – 20 μm . Auf AFM-Scans dieses Bereichs sind im Bild der Phase mehrere dunkle Areale erkennbar, die einen Durchmesser von 2 – 3 μm aufweisen und um ca. 1,5 – 3,0 Grad unterhalb der Werte in der Umgebung liegen. Anhand des lichtmikroskopischen Phasenkontrast-Bildes sind an den betreffenden Stellen zelluläre Strukturen erkennbar, die sich dunkel abzeichnen. (Abb. 38). Man kann davon ausgehen, dass es sich bei diesen Strukturen um Nucleoli handelt. Sie stellen Komplexe dar, in denen die ribosomale RNA der Zelle synthetisiert, prozessiert und mit den entsprechenden Proteinen zu Ribosomen kombiniert wird. Daher hängt die Größe der Nucleoli von dem Bedarf an Ribosomen und somit der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ab.¹²⁶

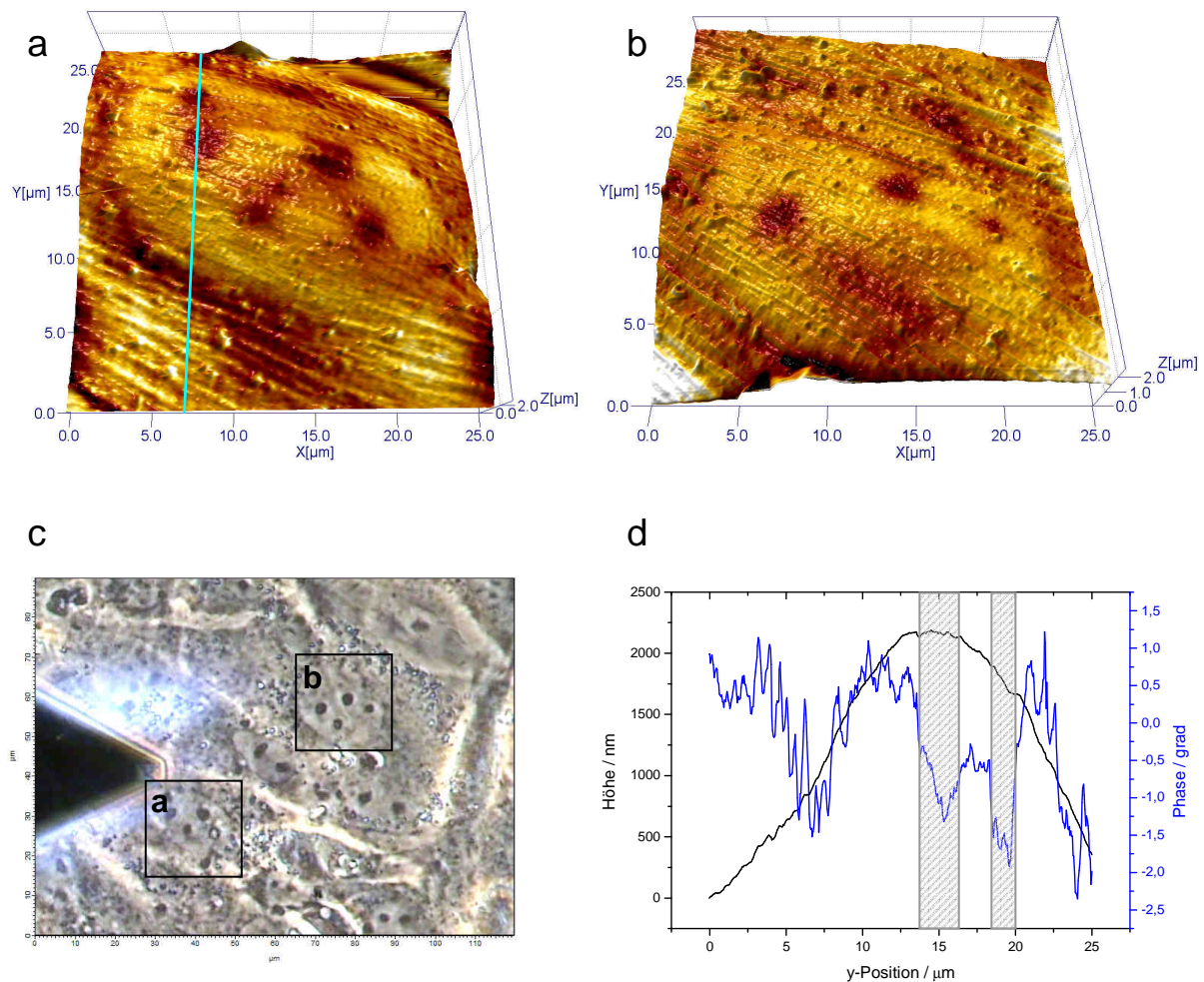


Abb. 38 Nucleoli innerhalb der Zelle (RLE-6TN) sind anhand des AFM-Phasensignals zu detektieren. Kombinierte Darstellung aus Topographie (3D) und Phase (farbcodiert) der Region des Zellkerns (a, b); das Profil (Linie in a) zeigt, dass die Nucleoli ein niedrigeres Phasensignal hervorrufen (markierte Bereiche), ohne in der Topographie erkennbar zu sein (d); die Lokalisierung aller Nucleoli in den AFM-Abbildungen stimmt mit den Positionen im lichtmikroskopischen Bild (dunkle Punkte im optischen Phasenkontrast) überein (c, Scanbereiche markiert).

Sowohl die Schwingungsamplitude wie auch die Topographie zeigen an diesen Stellen keine Unterschiede zur Umgebung (Abb. 38 d). Das zeigt, dass es sich um intrazelluläre Strukturen handelt, was in Anbracht der als Ursache angenommenen Nucleoli auch zu erwarten ist. Die Interpretation von Phasenbildern des AFM stellt ein aktuelles Forschungsgebiet dar.¹²⁷ Während Messungen an Luft bereits gut erklärt werden, kommen in Flüssigkeit weitere Effekte zum Tragen (z.B. Energietransfer in höhere Schwingungsmoden), die Erweiterungen

der Theorie notwendig machen.¹²⁸ Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde eine Anregungsfrequenz gewählt (ca. 230 kHz), die deutlich über der ersten Eigenmode des Cantilevers (ca. 14 kHz) im Bereich der 3. Eigenmode liegt. So kann die Probe bei gegebener Scangeschwindigkeit deutlich häufiger abgetastet werden. Auch der Gütefaktor der Schwingung liegt um den Faktor 100 über dem der Resonanzfrequenz, was zu der guten Bildqualität beiträgt. Die hier gemessenen Phasenwerte betragen 90 bis 110 Grad, was als ein Anzeichen interpretiert wird, dass die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe insgesamt attraktiv ist. Theoretische Betrachtungen zur Energiedissipation gehen von einer Anregung nahe der Resonanzfrequenz aus, womit das Schwingungsverhalten des Cantilevers leichter zu beschreiben ist. Diese Unterschiede können eine direkte Übertragbarkeit auf das hier untersuchte System erschweren. Daher werden im Folgenden einige Ansätze qualitativ diskutiert.

Geht man von einer harmonischen Schwingung des Cantilevers aus, ist die Schwingungsphase φ gegeben durch:⁸²

$$\sin(\varphi) = \frac{\omega}{\omega_0} \frac{A}{A_0} + \frac{QE_{dis}}{\pi k A A_0} \quad \text{Formel 43}$$

wobei ω und ω_0 die Anregungs- und Resonanzfrequenz, A und A_0 die gedämpfte und freie Amplitude und E_{dis} die dissipierte Energie sind. Man kann annehmen, dass sich der erste Summand während der Messung des relevanten Bereichs nicht signifikant ändert und die Phasendifferenz lokale Unterschiede der Energiedissipation beschreibt.

Ursachen für eine Dissipation können beispielweise die Adhäsion der AFM-Spitze an der Probe wie auch die Viskosität der Probe sein.¹²⁹ Eine Veränderung der Oberfläche, die zu einer stärkeren Bindung der Spitze und damit größeren Adhäsion führt, ist nicht anzunehmen. Selbst wenn die Nucleoli direkt an der Kernmembran angelagert wären und deren Eigenschaften gegebenenfalls beeinflussen könnten, ist diese Membran durch das Cytoskelett und das umgebende Cytoplasma von der Zellmembran getrennt, mit der die AFM-Spitze in Kontakt kommt. In Bereichen geringerer Steifigkeit könnte die Adhäsion allerdings erhöht sein, wenn dort die Kontaktfläche zwischen Spitze und Probe ansteigt.⁸³ Es ist wahrscheinlich, dass die Nucleoli sich mechanisch anders verhalten als das sie umgebende Nucleoplasma, insbesondere da sie dichte Komplexe von Proteine darstellen, die zudem durch die chemische Fixierung vernetzt und stabilisiert werden. Das wird auch deutlich an Zellen, die aus Medien getrocknet wurden, die sich für diesen Zweck als wenig geeignet erwiesen haben (z.B. Wasser, Aceton oder Isopropanol). Unter diesen Bedingungen fallen die Zellen zusammen, wobei die Nucleoli weitgehend erhalten bleiben und als die höchsten Punkte im Bereich des Zellkerns erkennbar werden (Abb. 41). Da das Nucleoplasma eine hohe Viskosität besitzt¹³⁰ und die Nucleoli wahrscheinlich eine größere Steifigkeit aufweisen als ihre Umgebung, können sowohl eine geringere Adhäsion im Bereich der Nucleoli wie auch eine viskoelastische Deformation des Nucleoplasmas¹³¹ dazu beitragen, dass die beschriebenen Differenzen in der Schwingungsphase auftreten. Verglichen mit der Zelloberfläche liegt die Phase im Bereich des Bodens der Kulturschale um etwa 10 Grad niedriger. Das Polystyrol weist klar einen höheren E-Modul (ca. 1,2 GPa)¹³² als die Zelle und eine zu vernachlässigende Viskosität auf. Es ist daher plausibel, dass sich die Nucleoli in gleicher Weise – wenn auch weniger deutlich – von der sie umgebenden Zelle unterscheiden.

Unter der Annahme, dass Formel 43 auch unter den hier vorliegenden Bedingungen gilt, würde allerdings ein niedrigerer Wert der Phase eine größere Energiedissipation bedeuten (der absolute Wert der Phase liegt immer über 90 Grad). Nach den genannten Mechanismen wäre

das Gegenteil zu erwarten. Es steht noch ein weiterer Weg der Dissipation offen, bei dem es zur Anregung höherer Schwingungsmoden kommt. Dieser Vorgang ist effektiver auf Material mit hohem E-Modul,¹²⁸ was hier der Fall ist. Eine abschließende Klärung der Ursachen der festgestellten Phasendifferenzen erfordert weitere Untersuchungen des Phasenverhaltens höherer Schwingungsmoden. Aus allen Ansätzen geht jedoch hervor, dass die Zelle im Bereich der Nucleoli sich ähnlich verhält, wie der vergleichsweise steife Schalenboden. Es kann somit gezeigt werden, dass AFM im Tapping Mode in der Lage ist, auch intrazelluläre Strukturen zu detektieren, wenn sie zu mechanischen Heterogenitäten der Probe führen. Diese sollten ebenfalls durch aufgenommene NP hervorgerufen werden. So öffnet sich eine Möglichkeit, ohne die Notwendigkeit einer Fluoreszenzmarkierung allein durch AFM die Bindung und Aufnahme von NP in Zellen zu verfolgen. Für eine eingehende Untersuchung der Leistungsfähigkeit dieser Technik ist die dreidimensionale Lokalisierung der Strukturen in der Zelle notwendig, um die Reichweite der beschriebenen Effekte zu vermessen. Zu diesem Zweck bleibt die Kombination mit Konfokaler Fluoreszenzmikroskopie notwendig. Durch 2PLSM wurden in ersten Versuchen Nucleoli und die Zellmembran selektiv markiert, so dass in weiteren Untersuchungen parallel dazu AFM-Messungen durchgeführt werden können. Der praktische Wert solcher Methoden zeigt sich beispielsweise an einer ähnliche Technik, bei der die Ausbreitung von Ultraschallwellen in der Zelle durch AFM detektiert wird, so dass intrazelluläre CNT lokalisiert werden können.¹³³

AFM kombiniert mit Fluoreszenzmikroskopie

Der Aufbau des AFM auf einem optischen Mikroskop stellt für die Untersuchung von biologischen Zellen eine große Erleichterung dar, wobei nicht nur Zellen durch optische Kontrastverfahren zur Messung ausgewählt werden können, sondern durch Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie relevante Bereiche zu selektieren sind. In Anbetracht der Herausforderungen, die bei der Identifizierung der NP-Agglomerate auf der Zelloberfläche auftreten stellt die Verwendung von fluoreszierenden Partikeln eine elegante Lösung dar. Auch in anderen Bereichen der Forschung werden durch Kombination dieser Techniken Synergieeffekte erzielt, die neue Möglichkeiten eröffnen.¹³⁴ Als Modellpartikel wurden hier fluoreszierende Polystyrol-Kügelchen (Fluospheres, FS) mit einem Durchmesser von 100 oder 500 nm eingesetzt. Diese Dimensionen entsprechen denen der NP-Agglomerate in den eingesetzten Medien. Ihre Bindung auf der Zelloberfläche sowie die Aufnahme durch die Zelle sind anhand von Übersichtsscans und vergrößerten Ausschnitten daraus analysiert worden.

Die Beads bilden sowohl in Wasser als auch in Kulturmedium eine stabile Dispersion ohne dass es zu einer Agglomeration kommt. Dies wird gemäß den Informationen des Herstellers durch die negative Ladung der mit Carboxygruppen funktionalisierten Oberfläche bewirkt. Inkubiert man die Zellen mit einer Dispersion von FS, binden diese auf der Oberfläche und werden in die Zelle aufgenommen, wie mittels AFM an fixierten Proben untersucht wurde. Man erkennt deutlich die einzelnen Partikel auf der Zelloberfläche (Abb. 39). Wie für NP-Agglomerate beschrieben, weisen auch FS einen so großen Durchmesser auf, dass die Form auf Grund der Faltung mit der Spitzengeometrie nicht sphärisch sondern pyramidal erscheint. Vergleicht man die AFM-Darstellung und das fluoreszenzmikroskopische Bild, ist eine genaue Identifikation der Partikel möglich, die unabhängig von der Größe der Partikel im AFM-Bild ist. Das ist von besonderer Relevanz für kleinere Partikel als die hier verwandten FS (\varnothing 500 nm), denn die natürliche Oberfläche der Zellen weist eine raue Struktur mit Protrusionen im Bereich einiger 100 nm auf. Das Fluoreszenzbild zeigt alle FS unabhängig von ihrer vertikalen Position, während im AFM-Bild nur die an der Oberfläche gebundenen

FS zu erkennen sind (Abb. 39 gelbe Pfeile). Partikel, die in der AFM-Darstellung „fehlen“, befinden sich innerhalb der Zelle (Abb. 39 roter Kreis). So sind nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei 37 °C etwa 40 % der FS ($\text{\O} 500 \text{ nm}$) aufgenommen worden. Dieser Vorgang ist bei kleineren Scanbereichen genauer zu erkennen (Abb. 40). Die topographische Darstellung der Zelle zeigt drei an der Oberfläche gebundene FS, deren Höhe ca. 420, 445 und 470 nm beträgt. Sie befinden sich damit praktisch noch auf der Oberfläche. Dagegen ist die Aufnahme eines weiteren Partikels fast vollständig vollzogen, was an der Höhe von ca. 70 nm abgelesen werden kann. Wie bereits dargestellt wurde, übt die AFM-Spitze laterale Kräfte auf Strukturen größerer Höhe aus. Während das in den meisten Fällen zu seitlichen Ausweichbewegungen führt, können schwach gebundene Partikel auch von der Zelle entfernt werden. Das ist durch Vergleich von Fluoreszenzbildern vor und nach dem AFM-Scan festzustellen. Der in Abb. 40 gezeigte Bereich wurde mehrfach mit dem AFM gescannt und dabei ein Partikel von der Zelle gelöst (blau markiert).

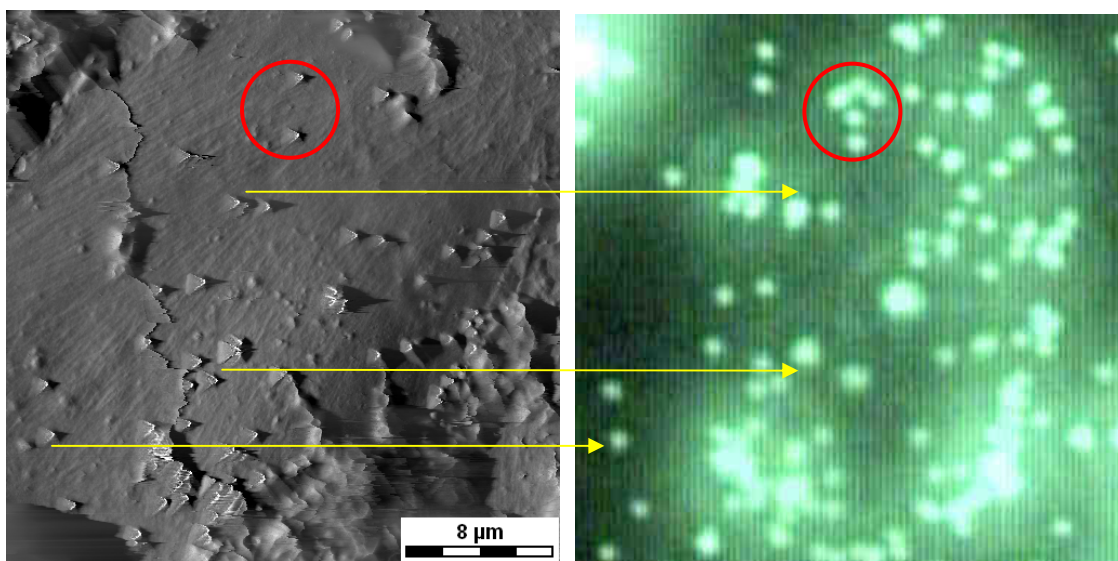


Abb. 39 Zelle (RLE-6TN) mit FS (carboxyliert, $\text{\O} 500 \text{ nm}$) inkubiert und nach 2,5 h fixiert, in Puffer. AFM, Contact Mode Deflection (a), Fluoreszenzbild selber Bereich vor AFM Abbildung (b)

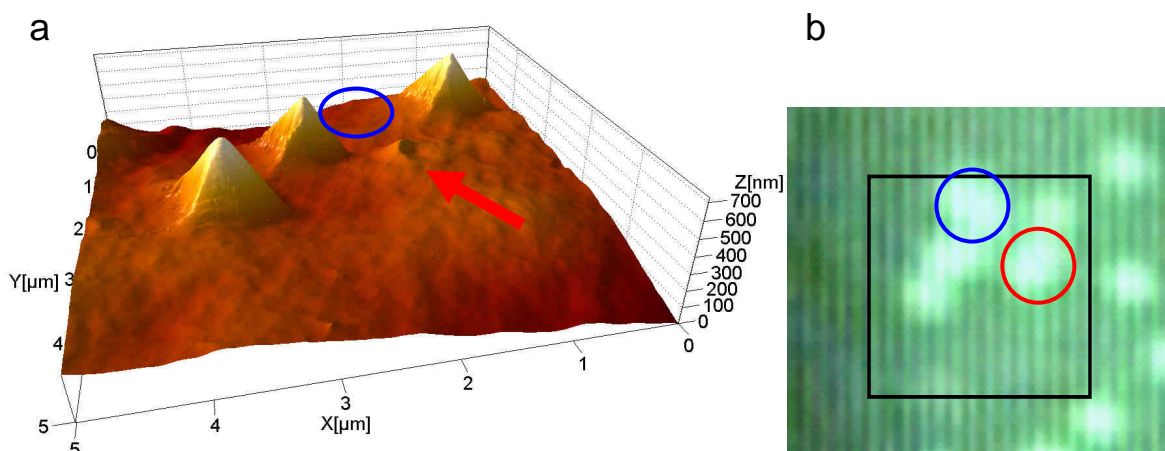


Abb. 40 FS Zelle (RLE-6TN) mit FS (carboxyliert, $\text{\O} 500 \text{ nm}$) inkubiert und nach 2,5 h fixiert, in Puffer. AFM, Contact Mode Topographie (a), Fluoreszenzbild selber Bereich vor AFM Abbildung (b). 3 FS an der Zelloberfläche gebunden, ein FS weitgehend von der Zelle aufgenommen (rot markiert), 1 FS durch vorherigen AFM-Scan entfernt (blau)

Dehydrierte Proben: AFM

Die bisherigen AFM-Untersuchungen zeigen, dass eine hochaufgelöste Darstellung von NP und deren Agglomeraten sowohl an Luft wie auch in wässrigem Medium erreicht wurde. Dazu ist eine Immobilisierung auf einer Oberfläche notwendig, die den durch die AFM-Spitze ausgeübten lateralen Kräften standhält. Während flache Bereiche der Oberfläche einer Zelle detailliert darstellbar sind, werden größere Strukturen durch die Spitze lateral verschoben. Die Kräfte werden auf die Zelle übertragen, die im Unterschied zu einer Glimmeroberfläche leicht deformiert wird und somit eine detaillierte Darstellung der gebundenen NP-Agglomerate verhindert. Dieses viskoelastische Verhalten lässt sich durch die Trocknung der Zellen weitgehend unterbinden. Hierbei wird das Wasser durch ein geeignetes organisches Medium ersetzt, das man darauf langsam und schonend entfernt. Die Form der Zelle bleibt dabei erhalten, da das Cytoskelett und die Cytoplasmamembran zuvor chemisch fixiert wurden. Oft wird das organische Medium (z.B. Aceton) durch flüssiges CO₂ ersetzt und dieses durch eine Kritischen-Punkt-Trocknung (CPD) entfernt.¹³⁵ Dieses Verfahren wird vielfach als Goldstandard angesehen, benötigt allerdings entsprechende Geräte und hoch aufgereinigtes CO₂. Unter geeigneten Bedingungen stellt die Trocknung an Luft eine gute (und preiswerte) Alternative dar. Hierbei kommen der Präparationstechnik und der Wahl des Mediums große Bedeutung zu, da die Trocknung eine entscheidende Ursache der Entstehung von Artefakten darstellt, die die Topographie der Zelloberfläche drastisch verändern.¹³⁶⁻¹³⁸ Während Aceton bei der Trocknung von Bakterien gute Ergebnisse liefert (Kap. 4.3.2), haben sich bezüglich der empfindlicheren tierischen Zellen Aceton sowie Isopropanol als wenig geeignet erwiesen. Die Membran der so getrockneten Zellen weist in weiten Bereichen große Poren auf und die Höhe des Zellkerns reduziert sich auf < 1µm, wodurch die Nucleoli hervortreten (Abb. 41). Der Nucleus selbst ist durch die Kernmembran vom Cytoplasma der Zelle getrennt und hebt sich im getrockneten Zustand durch eine relativ gleichmäßige Oberfläche und große Höhe von der übrigen Zelle ab. In der direkten Umgebung des Nucleus zeichnen sich viele partikuläre Strukturen von bis zu 300 nm Höhe ab, bei denen es sich um deformierte Zellorganellen handeln kann. In der Nähe des Kerns besitzt eine intakte Zelle die größte Höhe und da durch diese Art der Trocknung praktisch eine zweidimensionale Projektion erzeugt wird, ist die Zahlendichte der intrazellulären Strukturen hier am größten.

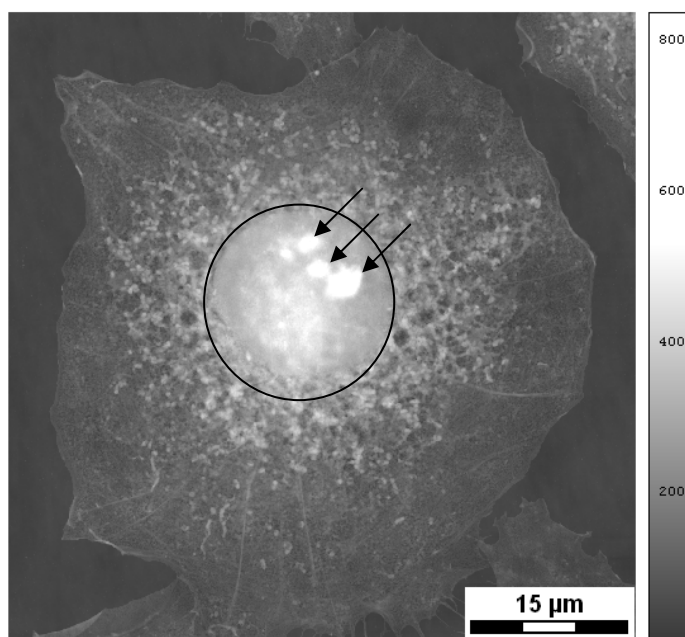


Abb. 41 Zelle (RLE-6TN) getrocknet aus Isopropanol, Topographie. Die Trocknung lässt die Zelle einfallen, so dass im Zellkern (Kreis) die Nucleoli deutlich hervortreten (Pfeile). Höhenskala 800 nm

Darstellungen solcherart behandelter Zellen können Informationen hinsichtlich intrazellulärer Elemente enthalten. Um allerdings die Cytoplasmamembran und darauf gebundene Partikel zu untersuchen, ist sie ungeeignet, hier ist eine Präparation notwendig, die die native Form der Zelle erhält. Die beschriebenen Veränderungen der Zelle werden durch den Einsatz von Hexamethyldisilazan (HMDS) bei der Präparation unterbunden (Abb. 42a). Die Chemikalie zeichnet sich durch eine besonders niedrige Oberflächenspannung aus. Diese übt während des Eintrocknens der Flüssigkeit einen Druck auf die Probe aus (H_2O : 13,8 MPa) und wird daher als eine entscheidende Ursache der Trocknungsartefakte angesehen.¹³⁹ HMDS wird beispielsweise zur Silanisierung von Festkörperoberflächen eingesetzt, auch Reaktionen mit biologischem Material sind möglich und können zu einer weiteren Fixierung der Probe beitragen.¹³⁶ In Gegenwart von Wasser tritt eine Hydrolyse auf (ohne dass es zu einer Polymerisation kommt, die zu Verklumpungen führt, vgl. APTES), so dass evtl. in der Probe verbliebene Spuren von Wasser chemisch entfernt werden, was die schonende Trocknung erleichtert.

Zellen, die in dieser Weise behandelt wurden, weisen eine maximale Höhe auf, wie sie auch in wässrigem Medium gemessen wird (Abb. 42a: ca. 5 μm). Die Membran stellt eine geschlossene Fläche dar, die relativ gleichmäßig zum Nucleus hin ansteigt. Anders als in Flüssigkeit zeichnen sich dabei keine Cytoskelettstrukturen durch die Membran ab. Das verdeutlicht die hohe Steifigkeit der getrockneten Zelle. Diese erlaubt darüber hinaus eine hoch aufgelöste Darstellung der Topographie der Zellmembran selbst. Deren Oberfläche weist eine Rauigkeit von etwa 15 – 20 nm auf, wobei der Wert bei größeren Scanbereichen auch durch die Unebenheit der Zellemembran beeinflusst wird und entsprechend höher ausfällt.

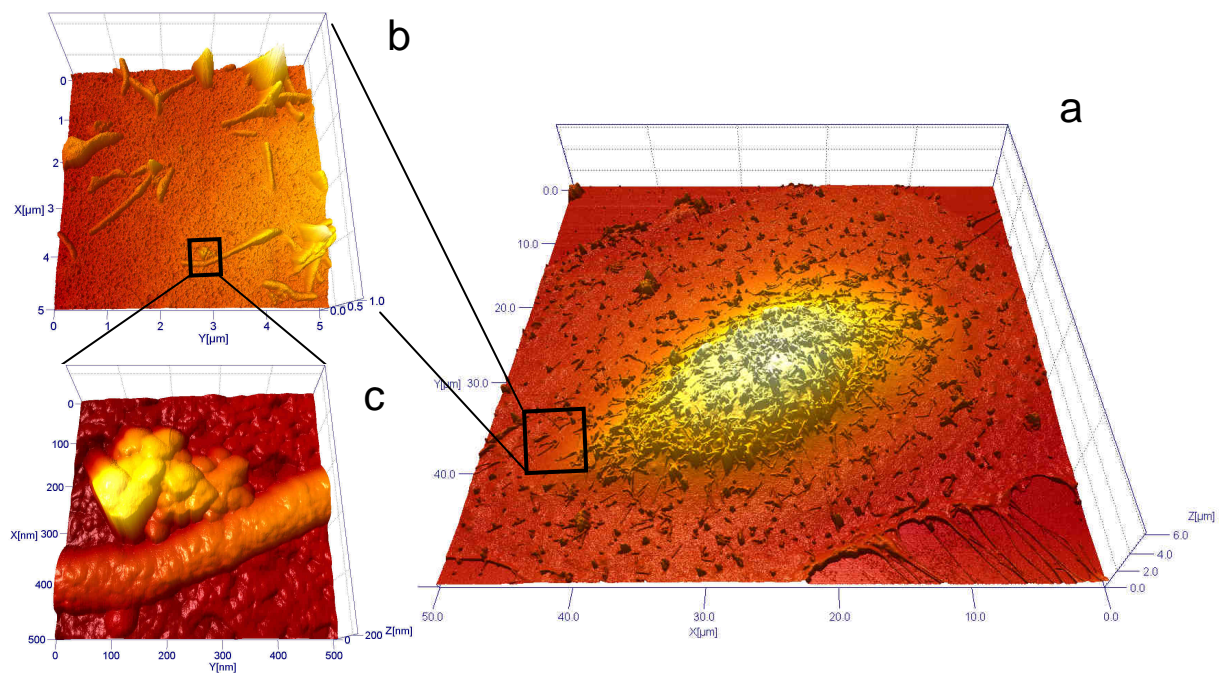


Abb. 42 Topographie einer A549 Zelle mit CeO_2 inkubiert, dehydriert und aus HMDS getrocknet. Die Struktur der ganzen Zelle bleibt intakt (a), Protrusionen sind als längliche Microvilli erkennbar (b, c), gebundene NP-Agglomerate werden bis auf die Ebene der Primärpartikel aufgelöst und sind aufgrund ihres Aufbaus zu identifizieren (c).

Auf der Zelloberfläche (A549 wie auch RLE-6TN) finden sich fingerartige Strukturen einer Länge von 1 – 3 μm und eines Durchmessers von ca. 100 nm (Abb. 42b). Hierbei handelt es sich um die zuvor beschriebenen Microvilli. Während in Flüssigkeit nur der jeweilige Verankerungspunkt an der Zelle als Protrusion erkennbar ist, haben die Microvilli infolge der Trocknung ihre Beweglichkeit verloren und können der AFM-Spitze nicht mehr ausweichen. Bei einigen Zelltypen (beispielsweise aus der Darmschleimhaut) ist ihre Dichte auf der Oberfläche so groß, dass sie sich in einer orthogonalen Anordnung zur Zellmembran befinden und sich auch gegenseitig während der Trocknung stabilisieren. Bei den hier untersuchten Lungenzellen kommen die Microvilli einzeln vor und liegen in der Regel nach der Trocknung an der Zellmembran an. Dadurch ist ihre Struktur durch AFM gut abzubilden. Man erkennt, dass die Oberfläche der Microvilli vollständig mit kleinen Erhebungen von < 10 nm Höhe und ca. 15 – 20 nm Breite bedeckt ist. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um natürliche Oberflächeneigenschaften handelt, sind vergleichbare Darstellungen in Flüssigkeit notwendig. Solche sind aus den genannten Gründen schwer erhältlich, so dass diese Frage vorerst offen bleiben muss. Die Microvilli bestehen vereinfacht aus einem Membranschlauch, der ein Aktinfilament umschließt. Die Entfernung des enthaltenen Cytoplasmas während der Präparation kann zu einem Schrumpfungsprozess führen, so dass die Membran sich teilweise auffaltet. Ein ähnliches Verhalten wird für Bakterienoberflächen diskutiert, wobei dort allerdings auch Abbildungen in verschiedenen wässrigen Medien vorliegen, was Aussagen über den Ursprung und die Entwicklung der Falten ermöglicht (Kap.4.3).

Die geschilderten Unterschiede zu den Darstellungen in Flüssigkeit lassen vermuten, dass auch die Abbildung von gebundenen NP auf getrockneten Zellen eindeutiger Aussagen ermöglicht. Das bestätigt sich, wie Abb. 42 c verdeutlicht. Hier ist ein NP-Agglomerat (CeO_2) auf der Zelloberfläche gezeigt, wobei der Aufbau aus einzelnen Primärpartikeln klar erkennbar ist (vgl. Abb. 30 a). Das kann als ein typisches Merkmal zur Identifizierung herangezogen werden und ist auch bei kleineren Agglomeraten wie dem dargestellten anwendbar. Die Größe liegt hier bei etwa 200 nm und ist damit vergleichbar mit zellulären Strukturen wie den Microvilli. Während bei Untersuchungen in Flüssigkeit eine Unterscheidung zwischen diesen kaum möglich ist, kann man bei getrockneten Proben nicht nur eine Zuordnung treffen sondern darüber hinaus die jeweilige Oberfläche detailliert darstellen. Größere Agglomerate sind ebenfalls in vergleichbarer Weise auf Zellen detektierbar. Bei der hier abgebildeten Probe (Abb. 42) sind gezielt nur kleine NP-Strukturen untersucht worden indem die NP-Dispersion zuvor filtriert wurde (Porengröße 200 nm).

Der maximale Scanbereich von 90 μm Kantenlänge (MFP-3D) ermöglicht die Abbildung ganzer und gegebenenfalls auch mehrerer benachbarter Zellen. Auf diese Weise ist ein Überblick der jeweiligen Probe zu erhalten. Aufgrund der Größe des abgerasterten Bildes sind solche Messungen sehr zeitaufwendig. Ein niedriges Rauschen des Signals erfordert kleine Scangeschwindigkeiten (< 10 $\mu\text{m/s}$), so dass die Messdauer im Bereich von mehreren Stunden liegen kann. Dabei sind auf Abbildungen ganzer Zellen (Kantenlänge des Bildes 50 μm) kleine Agglomerate kaum als solche erkennbar. Die Größe eines Pixels beträgt bei der maximalen Anzahl an Zeilen (MFP-3D: 1536, Multimode / BioScope: 512) etwa 30 bzw. 100 nm und liegt damit in der Größenordnung der Primärpartikel. Es ist daher unabdingbar, einzelne kleinere Bereiche der Zelle zu vermessen, die anhand des Übersichtsscans selektiert werden (Abb. 42 b). Hier kann der Übersichtsscan schneller erfolgen, allerdings steigt die Dauer durch die Messungen einzelner Areale. Daher wurden Vergleiche mit elektronenmikroskopischen Verfahren zur Abbildung der Zellen durchgeführt, wobei eine höhere Scangeschwindigkeit erreichbar ist.

Dehydrierte Proben: SEM

Im Vergleich zu AFM-Messungen ist für die Elektronenmikroskopie eine Trocknung der Zellen prinzipiell notwendig, da die Untersuchungen im Hochvakuum stattfinden (ausgenommen Environmental SEM). Zudem wird die Probe mit einer dünnen Metallschicht überzogen, um die Ableitung der Elektronen zu ermöglichen. Das Ziel der im Rahmen des NanoCare-Projektes durchgeführten Arbeiten ist es, mit AFM eine Messmethode zu evaluieren, mit der unter weitgehend physiologischen Bedingungen die NP-Bindung an Zellen analysiert werden kann. Verglichen damit finden elektronenmikroskopische Messungen unter sehr artifiziellen Bedingungen statt, nichtsdestotrotz wird SEM schon lange erfolgreich zur Untersuchung von Zellen eingesetzt.¹⁴⁰ Die Trocknung der Proben birgt höhere Risiken der Entstehung von Artefakten, als die darauf folgenden präparativen Schritte. Daher soll die Elektronenmikroskopie ebenso wie die AFM-Messung getrockneter Zellen als Methode zur Abbildung von auf Zelloberflächen gebundenen NP evaluiert werden.

Die Zellen wurden wie schon für die AFM-Messungen mit einer Dispersion der NP inkubiert und daraufhin präpariert. Die Abbildungen ganzer Zellen wurden bei einer 2000 – 3000 fachen Vergrößerung aufgenommen. Die abgebildeten Zellen weisen eine natürliche Gestalt auf. Auch wenn die Höhe der Zellen nicht direkt messbar ist, zeigen sie keine Hinweise auf Deformationen und besitzen eine geschlossene Membranoberfläche. Wie auch in AFM-Abbildungen sind in den Randbereichen bis ca. 10 µm lange fingerartige Ausstülpungen erkennbar (Abb. 43a, b). Diese sogenannten Filopodien stellen ebenso wie auch die Lamellipodien (Abb. 32) membranumschlossene periphere Bereiche des Cytoskeletts dar und dienen der Adhäsion an der Unterlage sowie der Fortbewegung der Zelle. Aufgrund ihres Durchmessers von ca. 100 nm sind sie relativ empfindlich und ein mögliches Abreißen oder Brechen kann als ein Hinweis auf mechanische Belastungen während der Trocknung oder durch Druckänderungen beim Aufbau des Vakuums dienen. Auch die Microvilli sind auf der Zelloberfläche klar erkennbar (Abb. 43b, c). Wie schon anhand der AFM-Abbildungen beschreiben, liegen sie auch hier auf der Cytoplasmamembran auf, was bestätigt, dass sie nicht etwa durch mechanischen Kontakt mit der AFM-Spitze niedergedrückt wurden. Die Cytoplasmamembran selbst weist eine unregelmäßige Struktur auf, die man als topographische Unebenheiten interpretieren kann. Die Größe der Strukturen liegt bei 30 – 100 nm. Es ist möglich, dass mikroskopischen Veränderungen wie die Entstehung von Poren beispielweise durch das Vakuum induziert wurden. Zudem kann die gesputterte Goldschicht (10 nm) eine gewisse Körnung aufweisen und damit hervorstehende Strukturen erzeugen. Zieht man allerdings die AFM-Darstellungen in Betracht, wird klar, dass die Zelloberfläche eine natürliche Rauigkeit aufweist. Die getrockneten Proben (RLE-6TN und A549) zeigen ähnliche Vertiefungen wie auch flache Protrusionen von vergleichbarer Größe (Abb. 42 b, c). Daher sind sowohl das Vakuum wie auch die Metallbeschichtung der Probe als Ursache unwahrscheinlich. Selbst in Flüssigkeit zeigt die Zelloberfläche Poren von 100 – 200 nm lateralem Durchmesser (Abb. 36), so dass auch ein natürlicher Ursprung der Oberflächenstrukturen möglich ist. Diese Resultate verdeutlichen, dass während der für SEM zusätzlich notwendigen präparativen Schritte die Struktur der Zelle weitgehend intakt bleibt. Die Methode in der hier durchgeführten Weise ist damit zur Abbildung von Zellen geeignet und wird nun zur Untersuchung der Interaktion mit NP eingesetzt.

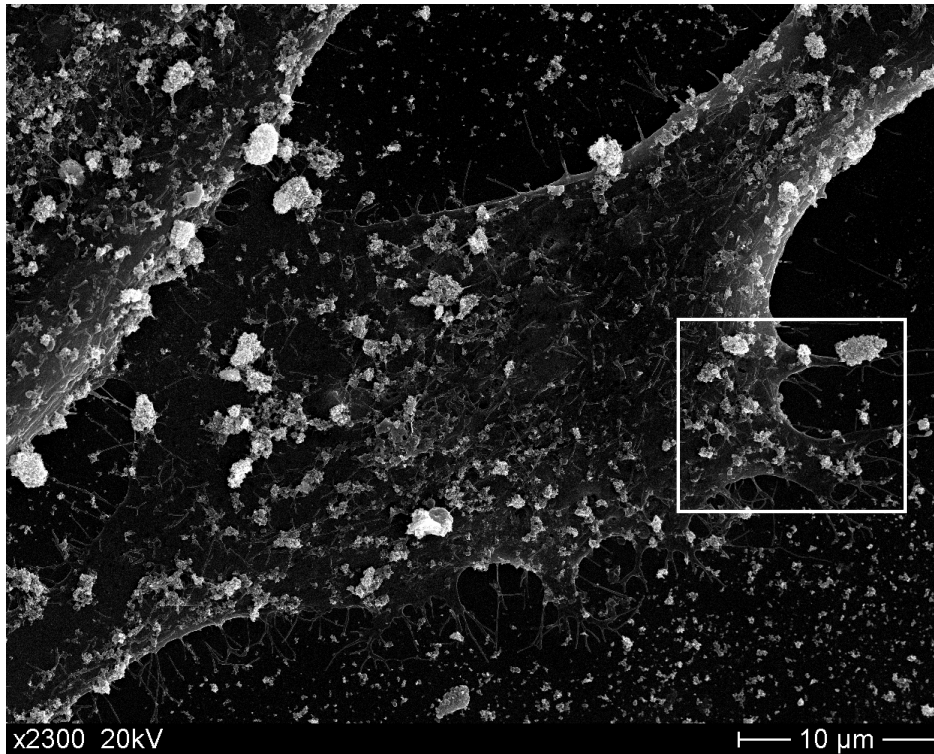
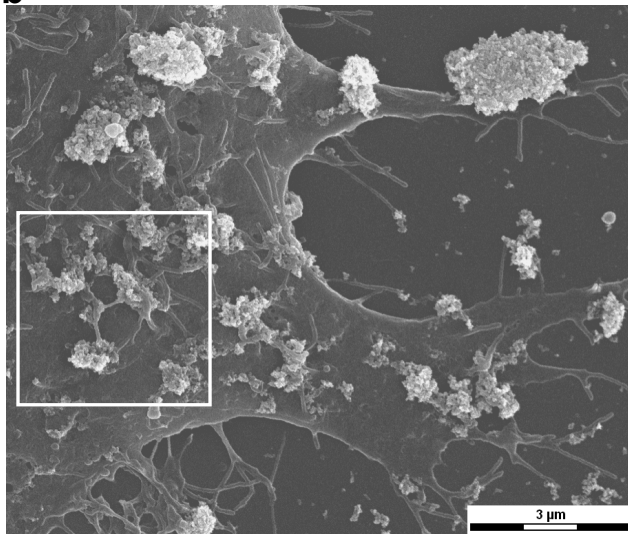
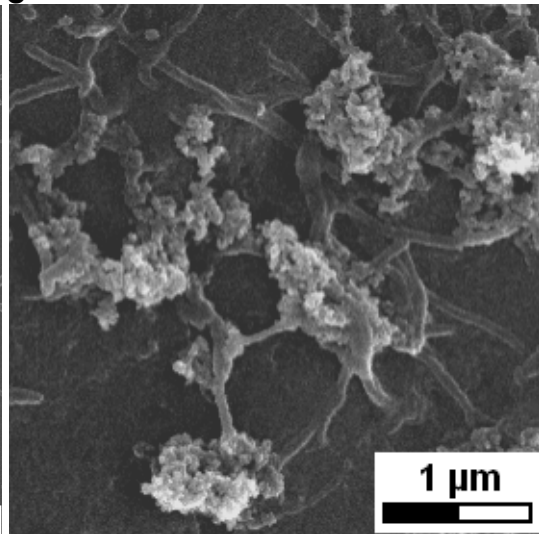
a**b****c**

Abb. 43 SEM-Abbildung einer RLE-6TN Zelle mit CeO₂ (Typ 3.2) inkubiert. Aufnahme einer ganzen Zelle (a, 4000 x 3200 Pixel) und nachträglich vergrößerte Ausschnitte aus dieser Messung (b, c).

Betrachtet man die von der Zelle gebundenen NP-Agglomerate, sind diese deutlich auf der Oberfläche zu erkennen. Große Agglomerate mit einem Durchmesser im μm -Bereich sind leicht auf dem Übersichtsscan (Abb. 43a) zu detektieren. Dagegen lassen sich kleinere Einheiten von einigen 100 nm Durchmesser erst in vergrößerten Ausschnitten identifizieren. Da die Abbildungen der ganzen Zelle mit einer hohen Anzahl an Messpunkten (Jeol JSM 880: 4000 x 3200) aufgenommen werden können, lassen sich die entsprechenden Ausschnitte ohne weitere Messungen direkt aus diesen Bilddaten vergrößern (Abb. 43b, c). Der Aufbau der NP-Agglomerate aus Primärpartikeln ist wie auch bei AFM-Messungen eindeutig zu erkennen. Das zeigt, dass eine einzige SEM-Abbildung einer Zelle zur Identifikation der darauf gebundenen NP-Agglomerate ausreicht.

Um eine detailliertere Darstellung der Zelloberfläche zu erhalten, sind einzelne Bereiche in höherer Vergrößerung untersucht worden. Hier zeigt sich die Strukturierung der Membran wie auch der Aufbau der NP-Agglomerate noch deutlicher (Abb. 44, Darstellung 300 dpi, dagegen in Abb. 43c 100 dpi). Die als Agglomerate vorliegenden NP zeigen eine typische Gestalt, die von SEM-Darstellungen durch die Hersteller bekannt ist. Auf der natürlichen Zelloberfläche kommen solche Strukturen nicht vor, was auf SEM- wie auch auf AFM-Darstellungen die Identifikation als NP erlaubt. Als Überprüfung und Absicherung dieser Identifizierungsmethode wurde eine Elementaranalyse durch SEM-EDX durchgeführt. Die im zentralen Bereich von Abb. 44b vorgenommene Analyse ergibt mit 1,25 % einen signifikant erhöhten Anteil an Cer, der neben den übrigen in der Probe vorkommenden Elementen klar erkennbar ist. Vergleichsmessungen in anderen Teilen der Zelle zeigen lediglich diesen Hintergrund, jedoch mit 0,06 % keine Anwesenheit von Cer. Damit ist klar belegt, dass es sich bei der hier dargestellten Struktur um ein NP-Agglomerat aus Ceroxid handelt und die optische Identifikation aufgrund der Form der Agglomerate damit übereinstimmende Ergebnisse liefert. Im Regelfall ist anhand der Partikel-Anordnung eine Zuordnung möglich, die EDX-Analyse kann in einzelnen Fällen ergänzend eingesetzt werden. Eine standardmäßige Anwendung auf Abbildungen ganzer Zellen würde eine automatisierte Erkennung der NP gestatten, ist allerdings aufgrund der dafür benötigten Messzeit kaum praktikabel.

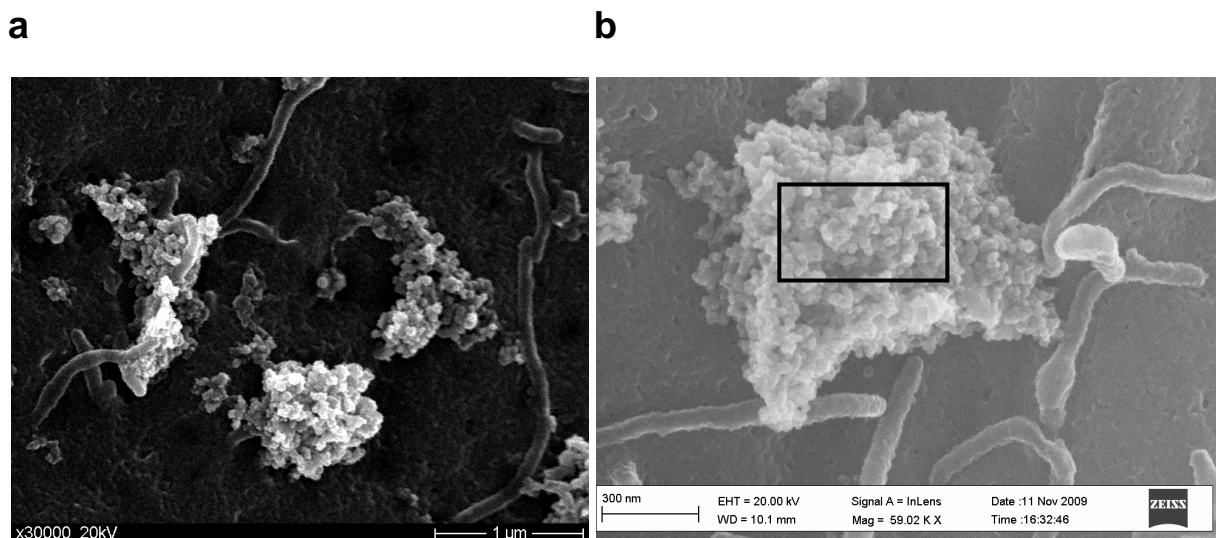


Abb. 44 SEM-Messung RLE-TN mit CeO₂ (Typ 3.2) inkubiert, Ausschnitt (a); SEM-EDX, die Elementaranalyse im markierten Bereich des NP-Agglomerates weist Cer nach (b)

Die NP sind primär gebunden auf der Zelloberfläche, einige finden sich auch neben den Zellen auf dem Glasboden (Abb. 43). Dabei handelt es sich vor allem um kleine Agglomerate von ca. 100 – 300 nm Durchmesser. Einheiten im Größenbereich von Mikrometern, wie sie auf der Zelloberfläche vorkommen, sind hier praktisch nicht vorhanden. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die Proben in einem Medium inkubiert wurden, in dem auch Proteine enthalten sind. Diese binden durch Adhäsion auf der Gefäßoberfläche (Kunststoff wie auch Glas) und eine ähnliche Wechselwirkung findet sehr wahrscheinlich auch an der Partikeloberfläche statt (Kap. 4.2.1). Es ist daher anzunehmen, dass die NP vermittelt über Proteine an die Glasoberfläche gebunden werden. Darüber hinaus können elektrostatische Wechselwirkungen beteiligt sein. Dabei sind attraktive Wechselwirkungen zwischen NP und Unterlage sowohl direkt bei ungleichnamiger Ladung als auch indirekt bei gleicher Oberflächenladung möglich. Im zweiten Fall ist eine Vermittlung durch mehrwertige

Kationen aus dem Medium in Betracht zu ziehen.⁹ Beim Waschen der Probe steigen die Fließgeschwindigkeit und damit die Scherkräfte mit dem Abstand von der Oberfläche an, so dass höhere Strukturen eher entfernt werden. Allerdings verbleiben an der Zelloberfläche auch größere Agglomerate gebunden. Das zeigt, dass auf der Zelloberfläche eine stärkere Bindung der NP stattfindet als auf der Glasoberfläche. Hierfür lassen sich zwei Gründe anführen:

Während die Adsorption von Proteinen wie BSA (mit 71 % der Hauptbestandteil der Proteine in FCS¹⁴¹) an der Partikeloberfläche wahrscheinlich unspezifisch ist, können hinsichtlich der Bindung an der Zelloberfläche weitere Proteine und darüber hinaus Lipide und Kohlenhydrate beteiligt sein. Hierbei sind auch spezifische Interaktionen mit einer höheren Affinität denkbar. Zum anderen ist die Zellmembran sehr flexibel und die Kontaktfläche mit dem NP-Agglomerat damit größer als auf der ebenen und starren Glasoberfläche. Es ist von einer Kombination beider Phänomene auszugehen, da eine lokale Bindung an die Zelle zu einer Verformung der Membran in der direkten Umgebung führen sollte. Das kann dadurch geschehen, dass sich weitere „Rezeptoren“ (oder auch unspezifische Bindungspartner) in diesem Bereich konzentrieren und durch diese Bindungen ein Prozess getriggert wird, der eine aktive Aufnahme in die Zelle zur Folge hat.⁴³ Gerade die Mechanismen der Aufnahme von NP in die Zelle bedürfen einer systematischen Untersuchung.¹⁴² Sowohl in Hinblick auf die Toxizität der Partikel als auch in Bezug auf potentielle Anwendungen von NP als Drug-Carrier z.B. in der Krebstherapie entfalten die Partikel ihre Wirkung erst innerhalb der Zelle. Daher ist die Kenntnis, auf welcher Basis die Bindung an der Zelloberfläche zustande kommt und welche Rolle sie für die Aufnahme in die Zelle spielt, von entscheidender Bedeutung. Für die hier untersuchten NP kommen sowohl elektrostatische Wechselwirkungen mit verschiedenen Komponenten der Membran wie auch Interaktionen mit membrangebundenen Proteinen in Frage. Dabei können letztere sowohl unspezifisch sein (analog zur Adsorption von BSA) als auch auf einer spezifischen Bindung der Partikeloberfläche beruhen. Hier spielen die chemische Zusammensetzung und die räumliche Anordnung (kristallin, amorph) sowie adsorbierte Proteine eine Rolle. Beispielsweise soll bei der Verwendung von NP als Drug-Carrier die gezielte Funktionalisierung der Partikeloberfläche die bevorzugte Lokalisierung an bestimmten Zellen oder Geweben sicherstellen, die über entsprechende Rezeptoren verfügen.¹⁴³

In jedem Fall und besonders bei der hier untersuchten ungewollten Aufnahme von NP kann die Adsorption von Proteinen aus dem Blut oder dem Surfactantfilm in der Lunge eine Interaktion mit Zellen sowohl positiv wie auch negativ beeinflussen. Dabei werden neue Bindungsstellen geschaffen oder natürlich vorhandene überdeckt und so die Wechselwirkungen mit der Zelle, die ein Partikel ursprünglich aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften aufweist, verändert. Um diesem Phänomen Rechnung zu tragen, sind Wechselwirkungen zwischen Zellen und NP sowohl unter Bedingungen untersucht worden, die eine Proteinadsorption aus dem Medium wahrscheinlich oder aber unmöglich machen. Die von den Projektpartnern durchgeführten toxikologischen Tests fanden in Gegenwart von FCS statt. Daher sind die Zellen für diese wie auch alle zuvor diskutierten Abbildungen ebenfalls in solchen Medien präpariert worden, die der dortigen Testsituation entsprechen. Darüber hinaus sind kraftspektroskopische Messungen durchgeführt worden, welche die direkte Bindung der Partikeloberfläche ohne adsorbierte Proteine an der Zelle widerspiegeln (Kap. 4.2.4).

⁹ Beispielsweise werden adhärente Zellen an der Oberfläche von Kulturgefäßen gebunden, indem Calcium- oder Magnesiumionen aus dem Medium die jeweils negative Nettoladung der Zellmembran und der Unterlage kompensieren und beide so verbrücken.

Entwicklung einer Methode zur Dynamischen Inkubation der Zellen mit NP

Da die toxikologischen Tests durch Überschichten der Zellen mit der jeweiligen NP-Dispersion durchgeführt werden, ist in diesen Untersuchungen ebenso verfahren worden. Hierbei ist zu beachten, dass nur die Partikel eine Wirkung auf die Zelle ausüben können, die in der Inkubationszeit in Kontakt mit der Oberfläche kommen. Es ist weiterhin die Reaktionszeit der Zelle auf eine potentielle Wirkung der aufgenommenen NP zu berücksichtigen. Im Unterschied zu im Medium gelösten Molekülen sind für dispergierte NP mehrere Transportmechanismen – Sedimentation und Diffusion – zur Zelle hin von Bedeutung. Die Sedimentationsgeschwindigkeit hängt unter anderem von dem Radius der Partikel ab, so dass größere Agglomerate die Zelloberfläche eher erreichen. Aufgrund der hydrodynamischen Eigenschaften der NP führt die Sedimentation zudem nur zu der Ausbildung eines Verteilungsgleichgewichts in der Flüssigkeit (Abb. 45, Tabelle 9), dessen Maximum abhängig von der Größe und Dichte der Partikel weit oberhalb des Bodens der Kulturschale bzw. der Zelloberfläche liegen kann.¹⁴⁴ Eine Berechnung nach der von Fauchaux und Libchaber hergeleiteten Gleichung ergibt für die mittlere Höhe h der Partikel über dem Boden:

$$h = \int_r^{t-r} z P_B(z) dz$$

$$= \frac{e^{-r/L}(rL + L^2) - e^{-(t-r)/L}[(t-r)L + L^2]}{L(e^{-r/L} - e^{-(t-r)/L})}$$

Formel 44

Mit $P_B(z)$: Boltzmann Dichte Profil, $L = k_B T / \Delta m g$: Boltzmann-Länge (abhängig von den Massen des Partikels und der Flüssigkeit), r : Radius des Partikels, t : Höhe der Flüssigkeitssäule.

Bei kleinen Agglomeraten ($\emptyset < \text{ca. } 100 \text{ nm}$) dominieren daher diffusive Prozesse, die langsamer verlaufen.^{145,146} Diese unterschiedlichen Transportmechanismen bestimmen sowohl das Ausmaß, in dem Partikel verschiedener Größe die Zelloberfläche erreichen können, als auch die dafür benötigte Inkubationszeit. Während bei dem gewählten Aufbau die Sedimentation einen gerichteten Transport zur Zelloberfläche bewirkt, stellt die Diffusion einen stochastischen Prozess dar. Wenn allerdings Partikel, die die Zelloberfläche erreicht haben, dort irreversibel gebunden werden, bildet sich ein Konzentrationsgradient aus. Dieser bewirkt, dass auch durch Diffusion die Partikel sich vermehrt in Richtung der Zelle bewegen. Bei kleinen Partikelkonzentrationen, die keine Sättigung der Aufnahme- oder Bindungskapazität der Zelle bewirken, ist dieser Vorgang nachweisbar.¹⁴⁷

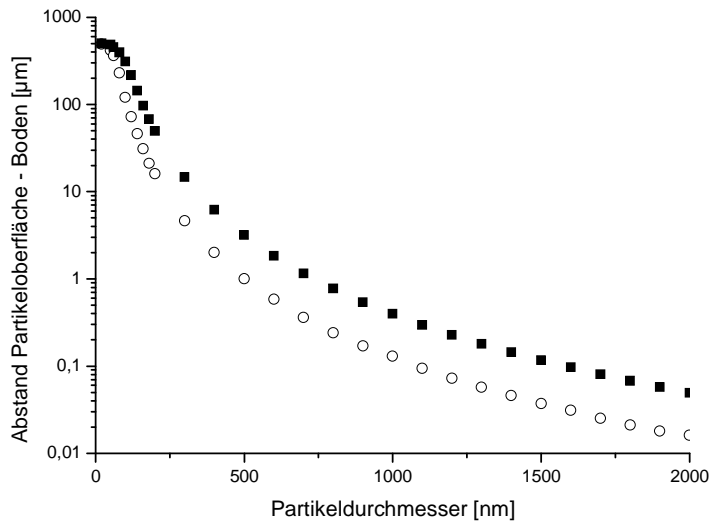


Abb. 45 Modellrechnung des Mittelwertes der Gleichgewichtsverteilung von Partikeln in einer Wasserschicht von 1 mm Höhe, Temperatur 20 °C, sphärische Geometrie der Partikel, $\rho(\text{Partikel})$ 7,3 g/ml (CeO_2) Kreise, 3,0 g/ml (Böhmit) Quadrate

\varnothing (Partikel) / nm	Abstand des Mittelwertes vom Boden / μm	
	$\rho(\text{Partikel}) = 3,0 \text{ g/ml}$	$\rho(\text{Partikel}) = 7,3 \text{ g/ml}$
50	470	420
200	49	16
2000	0,05	0,02

Tabelle 9 Berechnete Mittelwerte der Partikelverteilung in wässriger Dispersion für 2 Materialien unterschiedlicher Dichte ρ : 3,0 g/ml (Böhmit), 7,3 g/ml (CeO_2). Höhe der Flüssigkeit über Boden 1 mm, Temperatur 20 °C, sphärische Geometrie der Partikel

Bei der bisher in dieser Arbeit wie auch von den Projektpartnern verwendeten Inkubationstechnik gelangen größere Agglomerate früher und mit höherer Wahrscheinlichkeit in Kontakt zur Zelle als kleinere Agglomerate oder einzelne Primärpartikel. Daher können die Untersuchungen abhängig von der Inkubationsdauer ein unterschiedliches Bild der Größenverteilung der gebundenen NP-Agglomerate zeichnen. Zudem ist anzunehmen, dass die Aufnahme von kleineren Strukturen schneller stattfindet und eine lange Inkubation daher keinen Gleichgewichtszustand herbeiführt. Es ist möglich, bestimmte Aufnahmewege in die Zelle zu inhibieren, so dass gebundene Partikel auf der Zelloberfläche verbleiben. Da für einige Partikel die Beteiligung mehrerer verschiedener Aufnahmemechanismen berichtet wird,⁴⁵ ist eine vollständige Inhibition nicht immer gewährleistet. Es gilt daher, eine Methode zu finden, mit der NP in Kontakt zur Zelle gebracht werden, so dass sie eine repräsentative Größenverteilung der Dispersion aufweisen. Dazu wurde eine Technik entwickelt, bei der es nicht zu einer Sedimentation kommt, welche für die ungleichmäßige Verteilung verantwortlich ist. In einem vertikal ausgerichteten Kanal werden an einer Seitenwand die mit Zellen bewachsenen Glasträger fixiert und die NP-Dispersion parallel zu dieser Oberfläche vorbeigepumpt. Die Zelloberflächen binden so die NP direkt aus dem langsam fließenden Medium, so dass eine Sedimentation vermieden wird. Damit wird gleichzeitig bewirkt, dass ein gewisser „Selektionsdruck“ auf die Bindungen ausgeübt wird, da diese dem Flüssigkeitsstrom standhalten müssen. Mit der Fließgeschwindigkeit kann also eine weitere Einflussgröße eingeführt und variiert werden, so dass man zu einer dynamischen Inkubation

kommt. Damit werden eventuell Aussagen über die Bindungsstärke zwischen NP und Zelloberfläche möglich. Das Waschen der ungebundenen NP von der Oberfläche, das bei der zuvor beschriebenen statischen Inkubation notwendig ist, entfällt weitgehend. Die Reste der Dispersion lassen sich einfach durch Pumpen von Puffer aus dem Kanal entfernen. Das erhöht die Reproduzierbarkeit der Messung, da das Waschen der Proben sonst in Petrischalen durch mehrfaches Pipettieren von Hand geschieht.

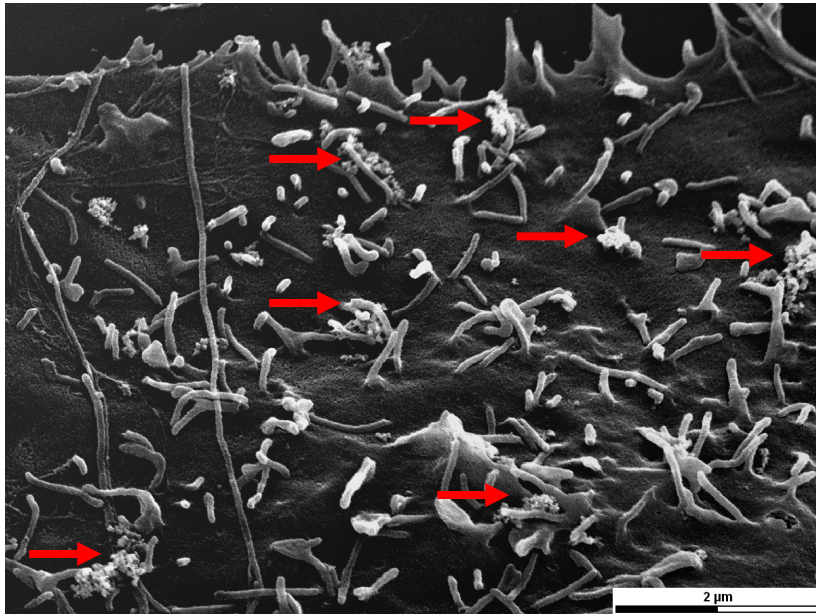


Abb. 46 SEM-Abbildung: Zelloberfläche RLE-6TN mit CeO_2 (Typ 3.2) nach dynamischer Inkubation. NP-Agglomerate markiert (Pfeile).

Die Abbildungen der Zellen nach einer dynamischen Inkubation mit einer NP-Dispersion zeigen, dass die Zellen auch hier Agglomerate an ihrer Oberfläche binden. Die meisten Agglomerate weisen einen Durchmesser unter $1\ \mu\text{m}$ auf (Abb. 46), vereinzelt werden auch größere Einheiten auf den Zelloberflächen gefunden. Insgesamt ist die Dichte der NP auf der Oberfläche kleiner als bei den Abbildungen von Zellen nach einer statischen Inkubation. Ein quantitativer Vergleich hier allerdings nicht sinnvoll, da die Unterschiede der Präparation dies kaum zulassen. Während bei der statischen Inkubation ein großer Teil der NP in der Flüssigkeitssäule über der Probe die Zelloberfläche erreichen wird,^r stehen bei der dynamischen Inkubation für eine Interaktion nur die NP in einem begrenzten Bereich wenige μm von der Oberfläche zur Verfügung.

Assoziation der NP an Microvilli

Bei der Auswertung sowohl der AFM- als auch der SEM-Abbildungen fällt auf, dass die NP-Agglomerate (CeO_2 , Böhmit) zwar auf der Cytoplasmamembran der Zellen gebunden sind, dabei aber sehr häufig assoziiert mit einzelnen oder mehreren Microvilli vorliegen. Diese Strukturen dienen unter anderem zur Vergrößerung der Oberfläche von Zellen beispielsweise des Darm- oder Lungenepithels und gestatten damit einen effizienteren Stoffaustausch mit der Umgebung. Dabei tragen sie viele Rezeptoren und Membranproteine,

^r Flüssigkeitshöhe über der Zelloberfläche während der Inkubation 0,8 mm (statisch), 1,0 mm (dynamisch)

die auch potentielle Bindungsstellen für NP darstellen. Die Assoziation mit den hier untersuchten NP ist ein Zeichen dafür, dass die Microvilli eine Affinität zu den NP aufweisen. Aufgrund vergleichbarer elektronenmikroskopischer⁴¹ und SICM-Abbildungen¹⁴⁸ von Polymerpartikeln auf Zellen wurde die Beteiligung von Microvilli am Bindungsprozess postuliert. Hinsichtlich der Bindung der Partikel lassen sich zwei Modelle entwickeln. In Flüssigkeit zeichnen sich die fingerartigen Strukturen durch eine hohe Beweglichkeit aus, die sie erst durch die Trocknung verlieren. Zum Einen können die Microvilli eine aktive Funktion übernehmen, indem sie im umgebenden Medium mit den frei diffundierenden NP interagieren und sie an ihrer Membran assoziiert halten. Da die Länge der Microvilli durch das interne Aktingerüst kontrolliert wird,¹⁴⁹ wäre es möglich, dass sich zurückbildende Villi gänzlich mit der Cytoplasmamembran verschmelzen und gebundene NP dort verbleiben. Auch ein aktiver Transport von gebundenen NP entlang der Microvilli zu Zelle ist denkbar.^{56,150} Ausgestreckte Microvilli neigen sich während der Trocknung zur Membran und halten die gebundenen NP dort in Position. So können sowohl an der Cytoplasmamembran als auch an den Villi gebundene NP erklärt werden. Auch eine eher passive Funktion der Microvilli ist möglich, bei der die NP hauptsächlich direkt an der Zellmembran gebunden werden, wo sie längere Zeit verbleiben. Kommen die beweglichen Villi in der Flüssigkeit in Kontakt zu diesen NP-Agglomeraten, bleiben sie mit ihnen assoziiert und behalten diese Position während der Trocknung bei. Die bisherigen Ergebnisse lassen beide Interpretationen zu. Es ist durchaus plausibel, dass die an der Bindung beteiligten Komponenten der Zelle nicht ausschließlich in der Membran der Villi *oder* der übrigen Zellmembran lokalisiert sind, wenn auch lokale Unterschiede der Konzentration und eventuell eine Clusterbildung möglich sind.

Es gibt Hinweise auf zelluläre Rezeptoren, die an der Bindung und Aufnahme bestimmter Partikel beteiligt sind. Im Fall von Alveolarmakrophagen ist der Scavenger-Rezeptor MARCO zu nennen, der eine Rolle bei der Phagozytose von SiO₂ und TiO₂ spielt.^{55,151} Neben den phagozytotischen Zellen des Immunsystems verfügen auch die Epithelzellen der Lunge über Membranproteine, die eine Partikelbindung bewirken können, wie das vor kurzem beschriebene Verhalten des Glycoproteins Syndecan-1 belegt. Es kommt ebenfalls auf Typ II Zellen des Alveolarepithels vor und ist in der Membran der Microvilli lokalisiert. Aufgrund einer Heparansulfat-Modifizierung verfügt es über eine hohe negative Ladung. Dieses Protein ist an der Bindung von positiv geladenen NP beteiligt, die daraufhin entlang des zentralen Aktinfilaments der Microvilli und Filopodien aktiv zur Zelle transportiert werden, wie G. Orr et. al. an fluoreszent markierten aminofunktionalisierten Silica-NP belegt haben.^{56,150} Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten NP weisen unterschiedliche elektrische Ladungen (zeta-Potential) auf, wobei die vier CeO₂-Modifikationen in reinem Wasser ebenfalls ein positives zeta-Potential (> 30 mV) besitzen. In den biologischen Puffern und Medien sinkt der Wert allerdings für die hier untersuchten wie auch für viele andere metalloxidische NP auf negative Werte (-7 bis -20 mV).^{53,147} In der Literatur finden sich nicht immer so detaillierte Daten hinsichtlich der tatsächlichen Ladung bzw. des zeta-Potentials der Partikel in den biologisch relevanten Medien. Eine direkte Übertragbarkeit der von G. Orr et al. beschriebenen Mechanismen ist daher nicht ohne weiteres gegeben, die Arbeit bietet aber gute Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen.

Die beschriebenen Fluoreszenzmikroskopischen Methoden gestatten eine relativ rasche und einfache Analyse des Partikeltransports entlang der Filopodien. Da diese schmalen Ausläufer flach auf dem Boden der Kulturschale anhaften (Abb. 33 unterer Bereich, Abb. 43b), sollte eine Untersuchung auch bei lebenden Zellen mittels AFM möglich sein, ohne dass Unebenheiten der Zelle die Identifikation der NP erschweren. Solche Messungen wären nicht mehr auf Fluoreszenzmarkierung der Partikel angewiesen. Transportvorgänge sollten durch eine Bilderserie nachzuweisen sein. Die bei dem Transport auftretenden Kräfte wirken lateral in einem willkürlichen Winkel zur AFM-Spitze, so dass sie durch AFM nur schwer zu

quantifizieren sind. Durch eine optische Pinzette wären solche Messungen eher zu realisieren. Diese Technik böte auch die Möglichkeit, optisch detektierbare Partikel gezielt in Kontakt zu den Filopodien zu bringen und den Transport lichtmikroskopisch zu verfolgen. Damit würden die Messungen unabhängig von zufälligen Kontakten zwischen Partikeln und Zellen.

4.2.4 Kraftspektroskopie zwischen NP und Zellen^s

Nachdem die Wechselwirkung von NP mit der Zelloberfläche durch verschiedene hochauflösende mikroskopische Verfahren anhand von Abbildungen charakterisiert wurde, soll nun der Fokus auf die Kräfte gelenkt werden, die diesen Interaktionen zugrunde liegen. Einige potentielle zelluläre Bindungspartner für NP sind bereits anhand der Bilder diskutiert worden und werden im Folgenden auch im Zusammenhang mit kraftspektroskopischen Untersuchungen eine Rolle spielen. Diese dienen der Quantifizierung der Bindungskräfte zwischen den NP und der Zelloberfläche und analysieren dabei NP, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung (CeO_2 , TiO_2 , SiO_2) oder aber der Oberflächeneigenschaften (verschiedene Modifikationen von CeO_2) unterscheiden. Darüber hinaus wird die Zelloberfläche auf lokale Unterschiede der Bindungsaffinität untersucht. Die Force-Volume Technik stellt damit ein kraftspektroskopisches Äquivalent zur Lokalisierung gebundener NP durch Abbildungen der Zellen dar.

Bindungskräfte unterschiedlicher NP

Ein wichtiges Thema, das im Rahmen des NanoCare-Projektes bearbeitet wurde, ist die Korrelation von chemischer Zusammensetzung der Partikel und möglichen toxischen Effekten auf die Zellen. Um den Einfluss auf die initiale Bindung an der Zellmembran zu untersuchen, wurden insbesondere Ceroxid und Titandioxid ausgewählt, die eine große Bedeutung im Substanzkatalog haben bzw. als Referenzmaterial dienen. Zudem repräsentieren sie Partikel mit positivem (CeO_2) wie auch negativem (TiO_2) zeta-Potential. Im Fall von CeO_2 wurden darüber hinaus Partikel mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften (BET, zeta-Potential) generiert. Dadurch soll geklärt werden, ob die Interaktion mit den Zellen und deren Reaktion auf die Partikel gezielt beeinflusst und damit das toxikologische Potential reduziert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden daher diese Partikel hinsichtlich der jeweils an der Zelloberfläche auftretenden Bindungskräfte untersucht.

Für die kraftspektroskopischen Messungen ist die Immobilisierung der Partikel an der AFM-Spitze essentiell. Dazu wurde ein NP-Aggregat durch Epoxid-Harz an der Spitze fixiert¹⁵² und schwach gebundene NP mittels einer Ultraschallbehandlung entfernt. Der Erfolg der Präparation wurde durch elektronenmikroskopische Abbildungen überprüft. Diese Technik zur Funktionalisierung hat den Vorteil, dass sie für die aggregiert vorliegenden NP universell einsetzbar ist und nicht auf eine an die Eigenschaften der Partikel angepasste chemische Modifizierung angewiesen ist.^t Die im Laufe des Projektes durch einen Industriepartner durchgeführten Versuche, einen Fluoreszenzfarbstoff kovalent mit den NP zu koppeln,

^s Die in diesem Abschnitt diskutierten AFM-Messungen wurden im Rahmen einer von mir angeleiteten Diplomarbeit von Herrn Sebastian Zünkeler durchgeführt.

^t Die Verwendung von auf Silanen basierenden Linkern kann hier in Betracht gezogen werden.

dokumentieren die dabei auftretenden Schwierigkeiten und unterstreichen den praktischen Nutzen der hier verwandten Methode zur Anbindung an die AFM-Spitze.

Die kraftspektroskopischen Untersuchungen wurden durch Force-Volume-Messungen in einem Bereich von $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$ über dem Zellkern der jeweiligen Zellen durchgeführt. Dadurch werden reproduzierbare Bedingungen für die unterschiedlichen Partikel gewährleistet. Weiterhin wird durch die Variation der Messposition sichergestellt, dass die Belastung für die Zelle minimal ist und es nicht zu lokalen Veränderungen oder gar einer Penetration der Membran kommt. Für alle Messungen wurde eine Rückzugsgeschwindigkeit von $3 \mu\text{m/s}$ eingestellt, was einer Loading-Rate von 180 pN/s entspricht. Die Kontaktzeit zwischen der funktionalisierten AFM-Spitze und der Zelloberfläche wurde zwischen 1 und 120 s variiert, wodurch zeitabhängige Veränderungen während des Bindungsprozesses erfasst werden können. Hierzu wurde die Kraft, mit der der Kontakt von NP und Zelle aufrechterhalten wird, konstant auf 200 pN gehalten und die z-Position des Cantilevers entsprechend nachgeregelt. Ein Vergleich der Bindungskräfte von NP unterschiedlichen Materials wird exemplarisch anhand der mit 2 s Kontaktzeit gemessenen Daten durchgeführt. Bei längeren Zeiten ($> \text{ca. } 5 \text{ s}$) kommen weitere Effekte wie Mehrfachabrisse zum Tragen, die gesondert im folgenden Kapitel diskutiert werden sollen.

Beim Zurückziehen des Cantilevers von der Zelle kommt es zu einer Adhäsion zwischen der NP-funktionalisierten Spitze und der Zelloberfläche, wobei für Kontaktzeiten $\leq 5 \text{ s}$ meist ein einzelner Abriss zu detektieren ist. Die dazu notwendige Kraft liegt im Mittel für CeO_2 (Typ 3.4) bei $34,3 \pm 12,0 \text{ pN}$ und für TiO_2 (Typ 1.2) bei $38,0 \pm 10,1 \text{ pN}$ (Gauß-Fit der Daten bei 2 s Kontaktzeit, Abb. 47). Beide Werte weisen eine Differenz von nur $3,7 \text{ pN}$ auf, so dass man davon ausgehen kann, dass es bezüglich der Interaktion der Partikel mit der Zelloberfläche keine deutlichen Unterschiede gibt. Die weiteren Messungen mit kurzer Kontaktzeit bestätigen diese Analyse. In Anbetracht der unterschiedlichen Materialeigenschaften (zeta-Potential in Wasser pH 7: TiO_2 $-26,3 \text{ mV}$, CeO_2 $+30,0 \text{ mV}$) sollte man davon ausgehen, dass sich hier signifikante Unterschiede ergeben, da für positiv geladene Partikel oft eine höhere Bindungsstärke an Zelloberflächen beschrieben wird, als für neutrale oder negativ geladene Partikel,^{57,153} wobei es hier auch abweichende Studienergebnisse gibt.¹⁴⁸ Bei den kraftspektroskopischen Untersuchungen wurde anders als bei der Inkubation der Zellen mit NP zu Abbildungszwecken dem Kulturmedium kein FCS zugesetzt, so dass eine Adsorption von Proteinen nicht möglich ist. Daher wird hier die direkte Interaktion der Partikeloberfläche mit den Zellen gemessen, sowohl die Bindung von adsorbierten Serumproteinen an Rezeptoren wie auch eine Maskierung der Partikeloberfläche unter einer passivierenden Proteinschicht werden ausgeschlossen. Allerdings kommt es auch in Kulturmedium zu einer Veränderung des zeta-Potentials der NP, das wahrscheinlich durch die gelösten (mehrwertigen) Ionen bedingt wird. Sowohl CeO_2 als auch TiO_2 weisen unter diesen Bedingungen ein schwach negatives zeta-Potential von ca. $8 - 10 \text{ mV}$ auf.⁵³ Damit können die geringen Unterschiede der Bindungskräfte durchaus mit einer Interaktion zwischen den NP und der Zelloberfläche in Einklang gebracht werden, die weitgehend auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. In den zitierten Arbeiten^{57,153} wurde dagegen die Ladung der Partikel gezielt durch eine kovalente Modifizierung der Oberfläche beispielsweise mit Aminogruppen gesteuert. Inwieweit diese Partikel mit organischen Gruppen auch in Kulturmedien ihre Ladung unverändert behalten und sich damit anders verhalten als die hier untersuchten metalloxidischen Oberflächen, bleibt in einigen Studien allerdings offen. Darin zeigt sich die Notwendigkeit einer sorgfältigen Charakterisierung der untersuchten Partikel unter den Bedingungen, unter denen die Versuche tatsächlich durchgeführt werden. Nur so sind die Beobachtungen mit den korrekten Parametern zu korrelieren.⁵¹

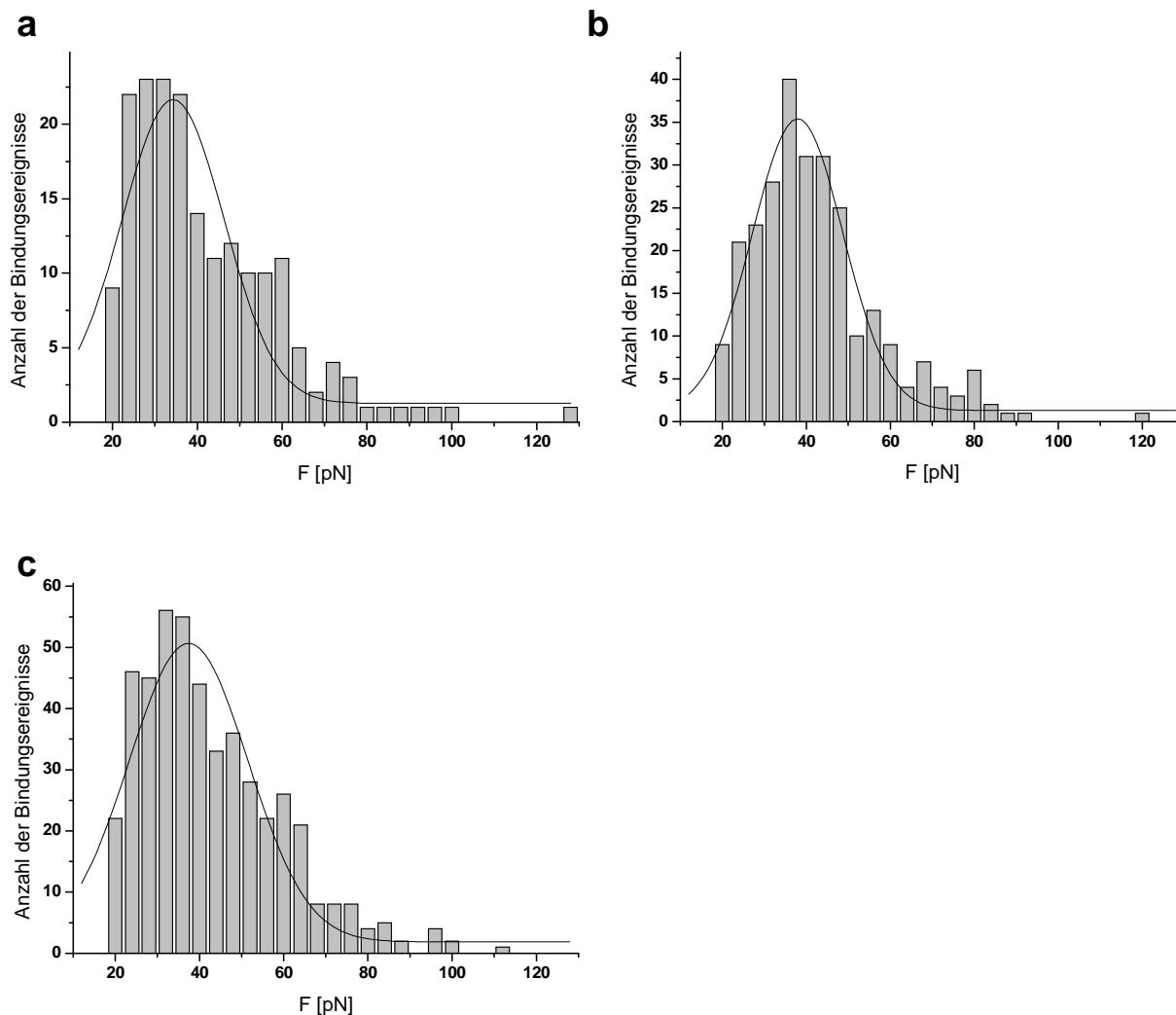


Abb. 47 Bindungskräfte zwischen der Zelloberfläche (RLE-6TN) und verschiedenen NP: CeO₂ (Typ 3.4) $34,3 \pm 12,0$ pN (a), TiO₂ (Typ 1.2) $38,0 \pm 10,1$ pN (b), SiO₂ (unmodifizierte AFM-Spitze) $37,4 \pm 14,1$ pN (c)

Ein weiterer Parameter, der im Unterschied zu kraftspektroskopischen Messungen an aufgereinigten Biomolekülen die Bindungskräfte beeinflusst ist die jeweilige Kontaktfläche zwischen den NP und der Zelloberfläche. Diese zu beschreiben ist nicht trivial, insbesondere da die Zellmembran sich abhängig von der Kontaktzeit und der ausgeübten Kraft der Form der AFM-Spitze anpasst. Wegen der bekannten und einfacher zu reproduzierenden Geometrie wurden beispielsweise der Apex einer unfunktionalisierten AFM-Spitze als Modell für SiO₂-NP eingesetzt¹⁵⁴ oder unterschiedlich an der Oberfläche modifizierte Kugeln mit bekanntem Radius (im μm Bereich) an der Spitze angebracht.⁵⁷ Eine direkte Berechnung der Kontaktfläche findet sich aber auch in diesen Untersuchungen nicht immer. Aufgrund der Fokussierung auf die von den Projektpartnern zur Verfügung gestellten NP waren solche Messungen hier nicht möglich. Die dreidimensionale Gestalt der funktionalisierten AFM-Spitzen wurde daher auch mittels der AFM-Abbildung eines inversen Gitters vermessen und anschließend durch die Software SPIP rekonstruiert (Abb. 48b). Die Abbildungen zeigen eine unregelmäßige und zerklüftete Struktur, wie sie für Aggregate der NP typisch ist, so dass die Abschätzung der Kontaktfläche mit der Zellmembran schwer möglich ist. Für kurze Kontaktzeiten und kleine auf die Zelle ausgeübte Kräfte sollte sich die Kontaktfläche auf einen kleinen Bereich an der Spitze des Aggregats beschränken. Vergleichsmessungen mit

weiteren Spitzen, modifiziert mit den jeweils gleichen NP, bestätigen die an diesen Daten exemplarisch dargelegten Resultate. Auch der Vergleich mit Messungen bei längeren Kontaktzeiten im nächsten Abschnitt verdeutlicht durch das häufige Vorliegen von Einfachabrissen die enge lokale Begrenzung des Bindungsereignisses bei Kontaktzeiten unter ca. 5 s. Untersuchungen an NP, die als Primärpartikel stabil dispergierbar sind, sollten das Potential der Methode noch besser ausschöpfen können, wenn es gelingt, sie als geschlossene Schicht an der Spitze zu immobilisieren oder gar einzelne NP über einen Linker anzubinden. Eine Flüssigphasensynthese der Partikel bietet hier Vorteile gegenüber der Herstellung durch Pyrolyse, da so eher einzeln vorliegende Partikel erzeugt werden, die in Wasser eine stabile Dispersion bilden (Abb. 24). Bei den in diesem Projekt zur Untersuchung vorgesehenen NP aus der Flüssigphasensynthese war die Oberfläche allerdings durch adsorptiv gebundene organische Stabilisatoren belegt, was eine nachträgliche Funktionalisierung stark erschwert. Eine weitere Alternative könnte in der Beschichtung der AFM-Spitze mit dem zu untersuchenden Material oder dem entsprechenden Metall gefolgt von einer Oxidation der Oberfläche liegen. So wäre analog zu Leonenko et al.¹⁵⁴ an der Spitze eine Nanostruktur mit definierter Geometrie zu erhalten, wobei deren Oberfläche und innere Struktur sich allerdings von der eines metalloxidischen NP gleicher chemischer Zusammensetzung unterscheiden könnten.

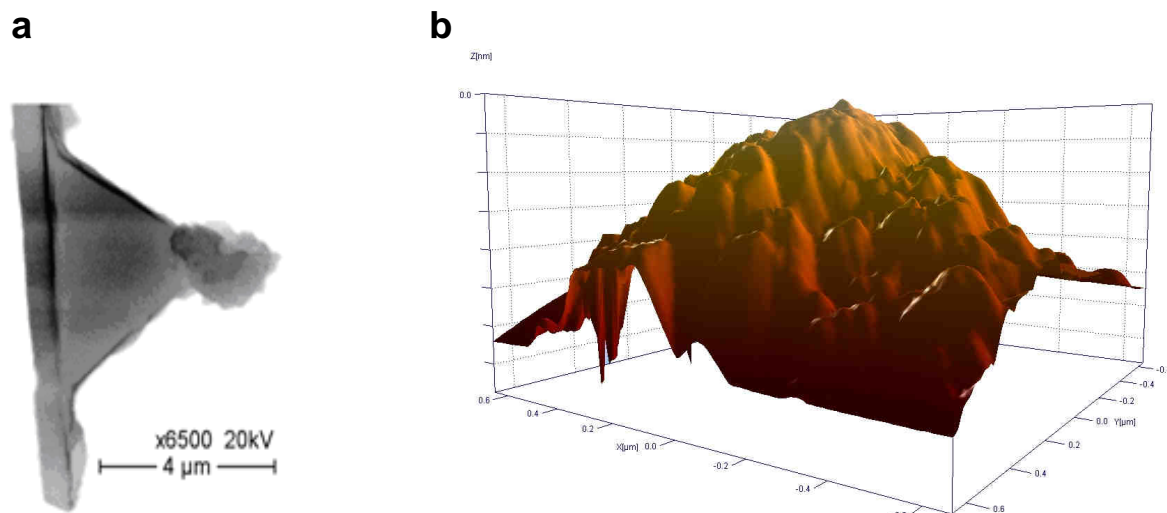


Abb. 48 AFM-Spitze funktionalisiert mit einem NP-Aggregat aus CeO_2 (Typ 3.4). SEM (a), AFM abgebildet durch ein inverses Gitter (b)

Einfluss der Kontaktzeit auf das Bindungsverhalten

Die Auswertung der Messkurven zeigt, dass es mit steigender Kontaktzeit zu deutlichen Veränderungen der Wechselwirkung zwischen der NP-funktionalisierten Spitze und der Zelle kommt. Dabei hat auch hier die chemische Identität der NP (TiO_2 wie auch CeO_2) keine signifikanten Unterschiede der Ergebnissen zur Folge (Abb. 50a, b). Bei kurzen Kontaktzeiten (≤ 5 s) ist zumeist ein einzelner Adhäsionspeak im Bereich von ca. 34 – 40 pN zu verzeichnen. Mit steigender Kontaktzeit nimmt die gesamte Abrisskraft zu, wobei nach einem Bereich großer Auslenkung mehrere Plateaus konstanter Kraft folgen, die jeweils durch einzelne Abrisse getrennt sind. Diese zeichnen sich häufig durch ähnliche Kräfte aus, die etwa 40 – 60 pN betragen. Die Anzahl der Abrisse nimmt mit steigender Kontaktzeit zu. Die letzten Abrisse finden in einem Abstand von bis zu 10 μm von der Zelloberfläche statt.

Aufgrund dieser langen Distanzen ist davon auszugehen, dass Teile aus der Zelle herausgezogen werden, die eine Verbindung zwischen Cantilever und Zelle halten. Es handelt sich daher um lokal begrenzte Membranschläuche – sogenannte Tether – die im Kontaktbereich zwischen Cantilever und Zelle entstehen. Dieses Verhalten soll nun genauer betrachtet werden.

Während des Kontaktes wird die Kraft zwischen der AFM-Spitze und der Zelle konstant gehalten und die funktionalisierte Spitze sinkt etwa 300 – 500 nm in die Zelle ein (Kontaktzeit ≥ 30 s). Die Zellmembran passt sich mit steigender Kontaktzeit der Form des NP-Aggregates immer mehr an, so dass die Kontaktfläche steigt. Ein solches Verhalten ist auch bei der Bindung und Aufnahme der NP zu erwarten. Hier werden Partikel-Aggregate von der Membran umschlossen, so dass sich ein endocytotischer Vesikel abschnürt, der beispielweise durch TEM-Untersuchungen nachweisen lässt.¹⁵⁵ Im Ergebnis führt das zur Messung einer erhöhten Adhäsionskraft, die im Bereich mehrerer 100 pN liegt (Abb. 49).

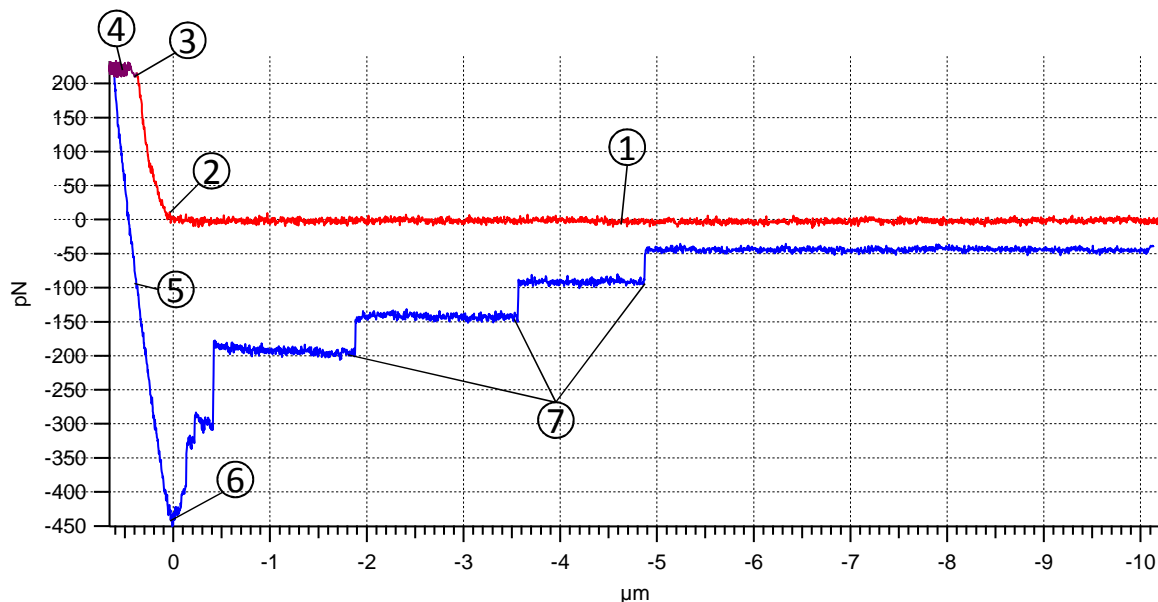


Abb. 49 Typische Kraft-Distanz-Kurve zwischen einer funktionalisierten AFM-Spitze und einer Zelle (RLE-6TN) bei einer Kontaktzeit von 60 s. (1) Kraftsensor weit entfernt von Zellmembran (keine Wechselwirkungskräfte); (2) Kontakt; (3) Spitze wird mit einer vorher definierten Kraft auf die Membran gedrückt; (4) Kraftsensor bleibt für die Zeit t in Kontakt; (5) Rückzugsbewegung; (6) Adhäsion (Bestandteile der Zelle sind noch am Sensor gebunden); (7) Abrisse einzelner Membrantether

Die Analyse der Messkurven zeigt, dass die gesamte Abrisskraft auf mehrere einzelne Abrissereignisse zurückzuführen ist. Diese sind oft durch lange Bereiche getrennt, in denen sich die AFM-Spitze von der Zelle entfernt, die Kraft aber konstant bleibt. Die Zellmembran reißt also gestaffelt von der Partikeloberfläche ab, wobei die verbleibenden Verbindungen weiter gedehnt werden, bevor eine weitere Bindung gelöst wird. Bei diesen Tethern handelt es sich um Membran-Nanoröhren mit einem Durchmesser im Bereich von etwa 100 nm,¹⁵⁶ deren Längenwachstum durch ein Reservoir von Lipiden aus der Zellmembran gespeist wird. Aus diesem Grund findet die Elongation ohne einen weiteren Anstieg der Kraft statt.¹⁵⁷ Das Abreißen eines Tethers stellt neues Material für die weitere Ausdehnung der verbliebenen Tether zur Verfügung.¹⁵⁸ Die Anzahl der Tether ist begrenzt, wächst aber mit steigender Kontaktzeit und damit wachsender Kontaktfläche zwischen dem NP-Aggregat und der Zelle (Abb. 50a, b). Dabei können sowohl mechanische Effekte wie auch biochemische Bindungsereignisse eine Rolle spielen.

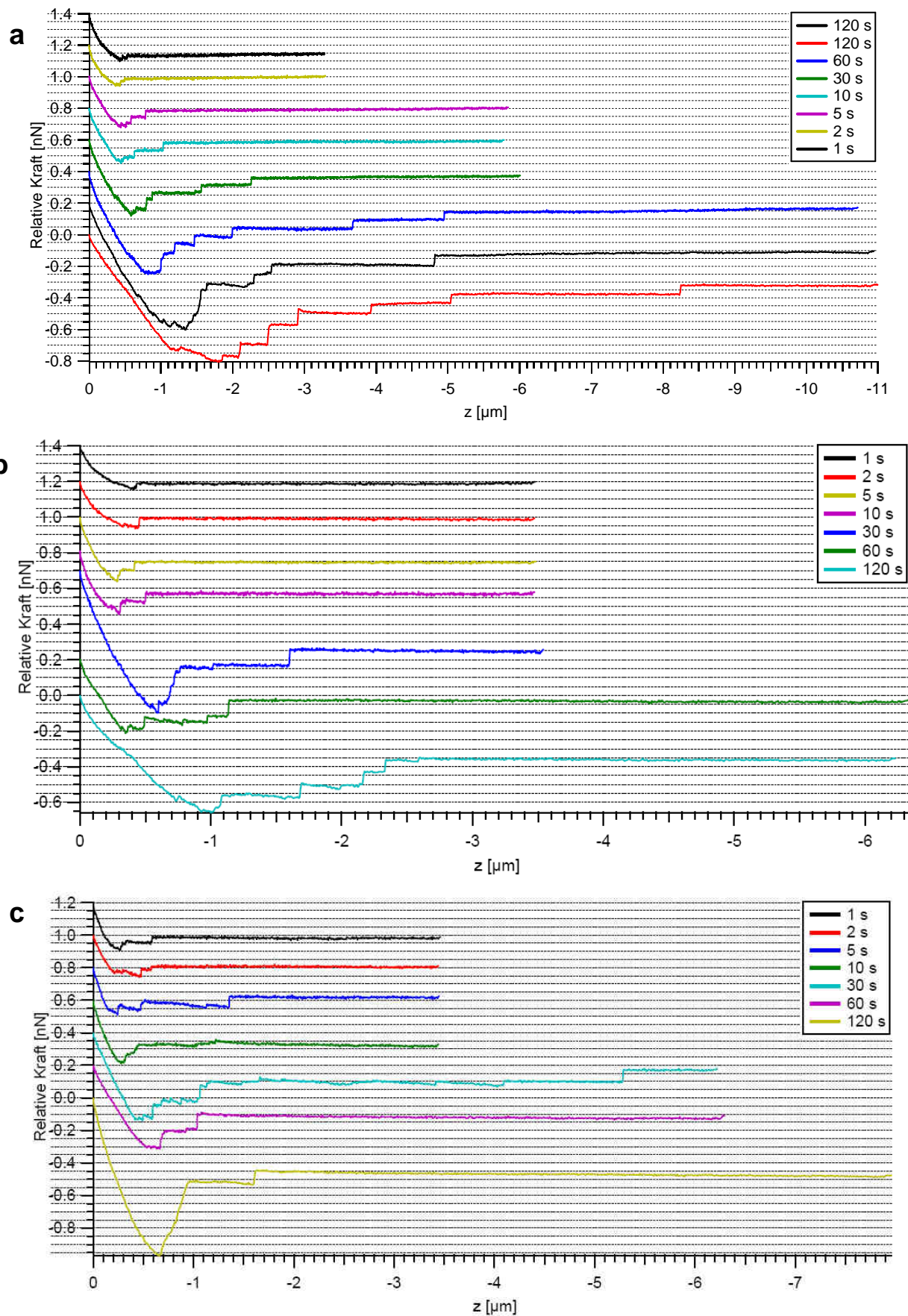


Abb. 50 Kraft-Distanzkurven der Bindung zwischen NP und Zelloberflächen von RLE-6TN. AFM-Spitze funktionalisiert mit (a) TiO_2 (Typ 1.2) und (b) CeO_2 (Typ 3.4) sowie (c) nicht funktionalisierte SiN-Spitze (SiO_2 -Oberfläche).

Neben den mit NP funktionalisierten Cantilevern wurden auch Messungen mit unbehandelten Spitzen durchgeführt. Diese stellen ein einfacheres System dar als die NP-funktionalisierten Spitzen mit ihrer komplexen Oberflächenstruktur. Damit liefern sie wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des Einflusses der geometrischen und mechanischen Parameter des Kontaktes. Bei diesen Untersuchungen entstehen die Tether schon bei kürzeren Kontaktzeiten von 1s (Abb. 50c). Da die unbehandelten Spitzen aufgrund ihres größeren Aspektverhältnisses einen höheren Druck ausüben und die Zellmembran auch bei kurzer Kontaktzeit stärker deformieren, kommt es hier schon früher zu einem engen Kontakt zur Membran. Dieser ist aber auf die kleine Fläche des Apex begrenzt, während die ebenen Seitenflächen der Spitze weniger Möglichkeiten bieten, einen engen Kontakt aufzubauen. Daher erreicht die Anzahl der Tether bei längerem Kontakt nicht die Werte der mit NP-Aggregaten funktionalisierten Spitzen. Diese weisen im Unterschied dazu neben der vordersten Spitze weitere hervorstehende Bereiche auf (Abb. 48), die bei längerer Kontaktzeit ebenfalls eng mit der Membran interagieren können. Das spricht dafür, dass ein lokal erhöhter Druck auf die Membran zu einer verstärkten Interaktion und damit auch der Ausbildung von Tethern führt.

Neben diesen mechanischen Effekten ist auch denkbar, dass die Zellmembran eine begrenzte Anzahl an Molekülen beinhaltet, die zu einer Erkennung und Bindung der NP fähig sind. Mit steigender Kontaktfläche würde eine Bindung somit wahrscheinlicher, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen deckt. Potentielle Bindungspartner müssten die Ausbildung der Membrantether gestatten, ohne dass die Bindung zuvor abreißt. Solche Strukturen könnten in den Microvilli vorliegen, die eine Affinität zu den NP aufweisen, wie bereits diskutiert wurde. Es ist bekannt, dass beim Transport von Neutrophilen (Zellen des Immunsystems) durch die Blutgefäße Adhäsionsproteine in den Spitzen der Microvilli den Kontakt zu den Zellen der Gefäßwand halten.^{159,160} Eine Längenausdehnung der Microvilli oder die Ausbildung von Membrantethern^u dient der Kompensation der durch den Blutfluss auftretenden Zugkräfte.¹⁶¹ Ein solcher Effekt könnte hier ebenso eine Rolle spielen. Um eine Beteiligung der Microvilli eingehender zu untersuchen, ist es möglich, ihre Struktur zu verändern oder eine vollständige Rückbildung zu induzieren. Da sie durch das zentrale Aktinfilament stabilisiert werden, führt eine Inkubation der Zellen beispielsweise mit Latrunculin zu einem Abbau der Microvilli.¹⁶² Um das Cytoskelett der Zelle in seinem nativen Zustand zu belassen, wäre die Verwendung von 2-APB vorzuziehen.¹⁶³ Diese Substanz lässt sich die Microvilli für den Zeitraum von ca. 20 min zurückbilden. Damit bietet sie die Möglichkeit, den Einfluss der Microvilli selektiv zu untersuchen. Da der Abbau der Microvilli reversibel ist, könnten mögliche Veränderungen der kraftspektroskopischen Messungen während der Wirkungsdauer der Substanz mit hoher Sicherheit den zeitweise zurückgebildeten Microvilli zugeordnet werden. Die bislang erarbeiteten Ergebnisse bilden eine gute Basis auf der solche Untersuchungen in Zukunft durchgeführt werden können.

Ein Vergleich der Abrisskräfte der unterschiedlichen NP ist bei längeren Kontaktzeiten auf Grund der Mehrfachabrisse schwer durchzuführen, denn hier kommen stärker als bei kurzen Kontaktzeiten auch die geometrischen Parameter der NP-Aggregate zum tragen. Es ist erkennbar, dass die gesamte Abrisskraft mit der Anzahl der Abrisse steigt. Dabei liegt die Mehrzahl der Einzelabrisse im Bereich von 40 – 60 pN und deutet auf das Abreißen der Tether von der funktionalisierten Spitze hin. Wie schon bei kurzen Kontaktzeiten dargestellt, sind auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen NP auszumachen. Dabei ist zu verzeichnen, dass die Ergebnisse bei längeren Kontaktzeiten stärker streuen. Die Größe der Abrisskräfte deckt sich gut mit an verschiedenen anderen Zellen gemessenen Werten von 10 – 60 pN für Tetherabrisse. Im Vergleich dazu werden für

^u Bei Kräften ≤ 34 pN verlängert sich der vollständige Villus, bei Kräften ≥ 61 pN bildet sich ein Tether. Der Vorgang ist abhängig von dem Ausmaß der Verankerung der Membran mit dem Aktinfilament im Inneren des Microvillus, wodurch auch der Übergangsbereich zwischen den Grenzwerten herrührt.¹⁶¹

das Zerreißen eines Membranschlauches etwa 100 pN angegeben,¹⁵⁸ so dass ein solcher Vorgang, der zu einer Schädigung der Zelle führen kann hier in der Regel nicht anzunehmen ist.

Um die Größe der Abrisskräfte sowie die Anzahl der Bindungsstellen einschätzen zu können, wurden Vergleichsmessungen mit einem natürlichen Liganden durchgeführt, der dessen Bindungsverhalten an Zelloberflächen bekannt ist. Hierzu wurde Fibronectin (FN) ausgewählt, das als Adhäsionsprotein in der Extrazellulären Matrix des Bindegewebes vorkommt und eine Verankerung der Zellen über die Bindung an Integrine vermittelt. Diese stellen Transmembranproteine dar, die eine Verbindung zum Cytoskelett besitzen und extrazelluläre Adhäsionsproteine wie FN beispielweise über die typische Aminosäuresequenz RGD erkennen und binden. Für diese Messungen wurden AFM-Spitzen mit FN inkubiert, das an deren goldbeschichteter Oberfläche gebunden wird. Bei einer Kontaktzeit mit der Zelle von 30 s liegt die Gesamtabrisskraft bei etwa 1 nN und damit deutlich über den für NP-funktionalisierte Spitzen bestimmten Werten. Berücksichtigt man, dass für einzelne Bindungen zwischen Fibronectin und dem Integrin $\alpha 5 \beta 1$ 35 – 60 pN gemessen wurden,¹⁶⁴ wird klar, dass die Anzahl der einzelnen Bindungen in diesem Fall deutlich höher sein muss, als es unter vergleichbaren Bedingungen zwischen NP und Zellen der Fall ist. Zudem gleicht die Spitzegeometrie der einer unbehandelten Spitze, für die ein enger Kontakt mit der Zellmembran eher im kleinen Bereich des Apex anzunehmen ist. Das zeigt, dass die spezifische Bindung von FN an der Membran den Kontakt verstärkt und wahrscheinlich auf die Flanken der Spitze ausdehnt. Weiterhin fällt auf, dass es bei FN-funktionalisierten Spitzen nicht zur Ausbildung von Tethern kommt. Für deren Entstehung ist jeweils ein gewisses Reservoir an Membranlipiden in der Umgebung der jeweiligen Bindungsstelle notwendig, die selbst nicht direkt mit der Spitze interagieren. Auch wenn die Bindungskraft zwischen FN und Integrin für die Ausbildung eines Tethers ausreichen sollte, sind diese Bindungen so häufig, dass nicht genügend Membranmaterial dazwischen liegt, um den Prozess zu erlauben. Verglichen mit der Dichte der Bindungsstellen für Fibronectin kann man daher annehmen, dass potentielle Bindungspartner für die untersuchten NP aus TiO_2 und CeO_2 wie auch für die nicht funktionalisierte AFM-Spitze (SiO_2) auf der Zelloberfläche in relativ kleiner Anzahl vorkommen.

Lokalisierung von Bindungsereignissen auf der Zelloberfläche

Nachdem die Bindungseigenschaften der NP mit der Zelle charakterisiert wurden, soll nun untersucht werden, ob es Unterschiede in verschiedenen Arealen auf der Zelloberfläche gibt. Für die bisherigen Messungen wurde ein kleiner Bereich von $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$ auf dem Zellkern erfasst, um vergleichbare Bedingungen für verschiedene Zellen zu gewährleisten. Nun wird der Force-Volume-Mode genutzt, um auf der gesamten Zelloberfläche Messungen durchzuführen. Die Scangröße beträgt $40 \times 40 \mu\text{m}$ bei 1600 aufgenommenen Kurven mit einer Kontaktzeit von je 0,1 s. So wird vor allem die Adhäsion der NP auf der Zelle erfasst, wohingegen die Bildung von Tethern, die eine automatisierte Auswertung erschweren, vermieden werden kann. Die Rückzugsgeschwindigkeit verbleibt bei $3 \mu\text{m/s}$, womit die Dauer einer Messreihe bei ca. 50 min liegt. Die Auswahl des Messbereiches erfolgt anhand des Videobildes (Abb. 51A). Da aus den F/d-Kurven auch die vertikale Position des Kontaktes mit der Zelloberfläche abzulesen ist, ergibt sich ein topographisches Bild (Abb. 51B) und eine Zuordnung der gemessenen Bindungskräfte (Abb. 51C) zu ihrer Lage auf der Zelloberfläche ist leicht möglich.

Betrachtet man die Adhäsionskräfte zwischen den NP (CeO_2 Typ 3.4) und einer Zelle (RLE-6TN), ergibt sich als Median der Verteilung ein Wert von 22,5 pN. Daraus erkennt man, dass bei einem großen Anteil der Messkurven nur eine sehr geringe Adhäsion zu verzeichnen ist, die deutlich unterhalb der zuvor bestimmten Bindungskraft von 34,4 pN liegt. Auch wenn die Präzision der Messungen in diesem niedrigen Kräftebereich durch das Rauschen limitiert ist, wird klar, dass in einem deutlichen Anteil der Zelloberfläche eine Bindung der Partikel nicht zu verzeichnen ist. Diese Beobachtung deckt sich mit den zuvor geschilderten Vergleichen der Dichte der Bindungspartner für NP und Fibronectin auf der Zelloberfläche.

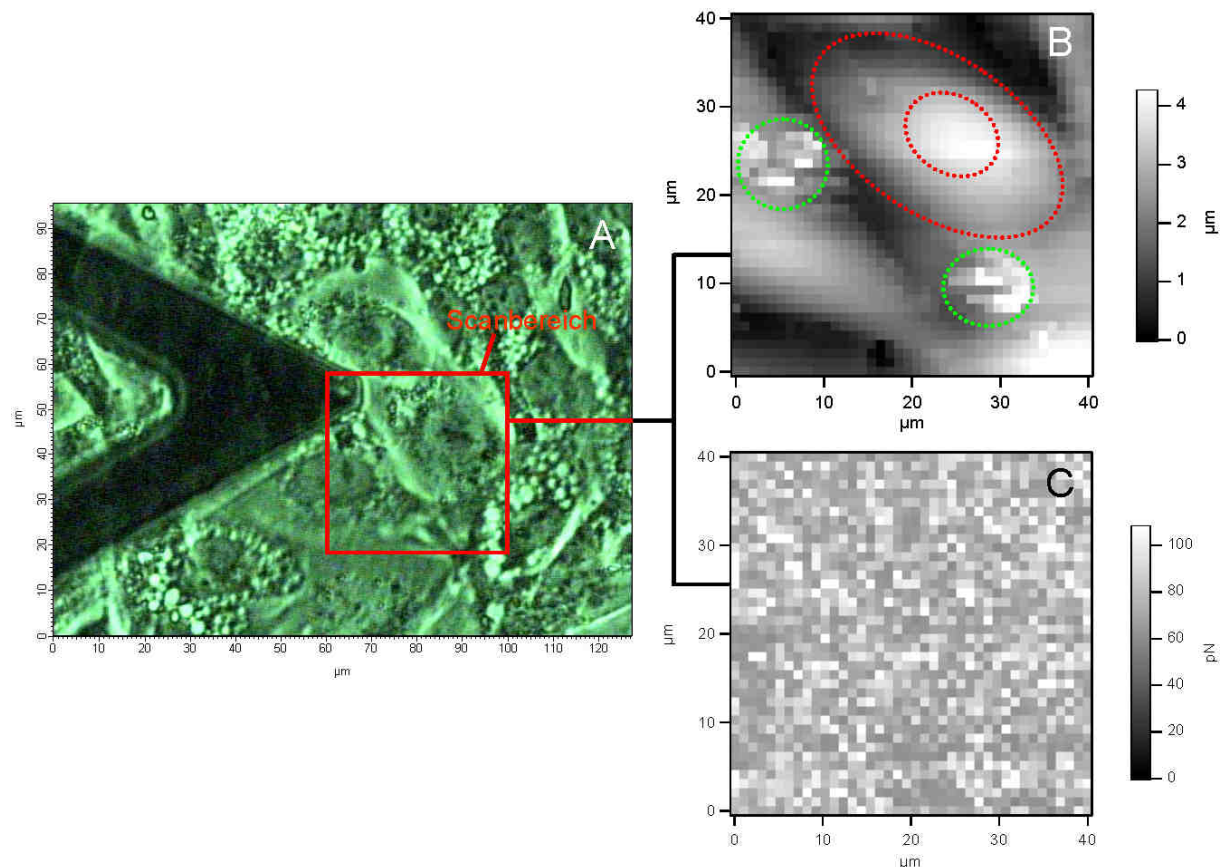


Abb. 51 Adhäsionskarte der Bindungskräfte zwischen NP CeO_2 (Typ 3.4) und Zelloberfläche (RLE-6TN). Optisches Bild der Zellen (A), die Topographie (B) entspricht dem ersten Kontakt zwischen AFM-Spitze und Zelle (ein Zellkörper und Nucleus rot markiert), die jeweiligen Abrisskräfte (C) der 40x40 Messkurven

Da die zuvor beschriebenen Messungen in einem kleinen Bereich auf dem Zellkern durchgeführt wurden, stellt sich die Frage, ob dieses Areal repräsentativ für die ganze Zelloberfläche ist. Eine optische Beurteilung der lokalen Verteilung der Bindungskräfte anhand der Abb. 51 c lässt vermuten, dass die Bindungsstellen – oder genauer die Positionen mit einer hohen Adhäsionskraft – gleichmäßig auf der Zelloberfläche positioniert sind. Um eine statistische Auswertung der Daten durchzuführen, wurde als Nullhypothese die Aussage gewählt, dass die Verteilungen im Bereich des Nucleus und der ganzen Zelle gleich seien. Die zu prüfende Hypothese besagt, dass es Unterschiede zwischen der Verteilung in diesen Bereichen gäbe. Zur Untersuchung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test gewählt. Hierzu wurde die kumulative Häufigkeit der Adhäsionskräfte im Bereich des Nucleus sowie der ganzen Zelle berechnet und verglichen. Übersteigt die Differenz zwischen beiden Größen an

einem Punkt den definierten Grenzwert, kann man die Verteilungen mit dem jeweiligen Signifikanzlevel als unabhängig bezeichnen. Die Grafik (Abb. 52) zeigt beide Verteilungen sowie die Grenzwerte des häufig gewählten Signifikanzniveaus $\alpha = 0,05$ und des zur Sicherheit deutlich größeren Wertes $\alpha = 0,20$. Diese Werte geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird. Die Grenzwerte stellen den Toleranzbereich um die Verteilung dar, die die ganze Zelle repräsentiert. Man erkennt, dass die Adhäsionskräfte im Bereich des Kerns geringfügig über denen in der ganzen Zelle liegen, allerdings ist dieser Unterschied nicht als signifikant zu werten. Die durch $\alpha = 0,05$ definierte Grenze wird in keinem Fall erreicht, selbst bei $\alpha = 0,20$ wird der Grenzwert nicht tangiert, auch wenn dies anhand der Grafik schwer erkennbar ist. Es ist daher anzunehmen, dass die Adhäsionskräfte, die auf dem Kern der Zelle gemessen wurden, repräsentativ für die ganze Zelle stehen. Das ist wichtig für die zuvor dargestellten Messungen bei unterschiedlichen Kontaktzeiten und Partikeln, die nur im Bereich des Nucleus durchgeführt wurden. Eine lokal höhere Bindungskraft oder Häufung von Bindungsereignissen in Kernbereich würde für eine heterogene Verteilung von Bindungspartnern auf der Oberfläche der Zelle sprechen. Ein solches Verhalten hätte Bedeutung für die Bindung und Aufnahme der Partikel. Die Ergebnisse sprechen aber für eine auf makroskopischer Ebene heterogene Verteilung der Bindungsereignisse und damit auch der potentiellen zellulären Bindungsstellen. Diese Analyse bestätigt die Beobachtungen, die anhand der Abbildungen gebundener NP auf der Zelloberfläche gemacht wurden (Kap. 4.2.3).

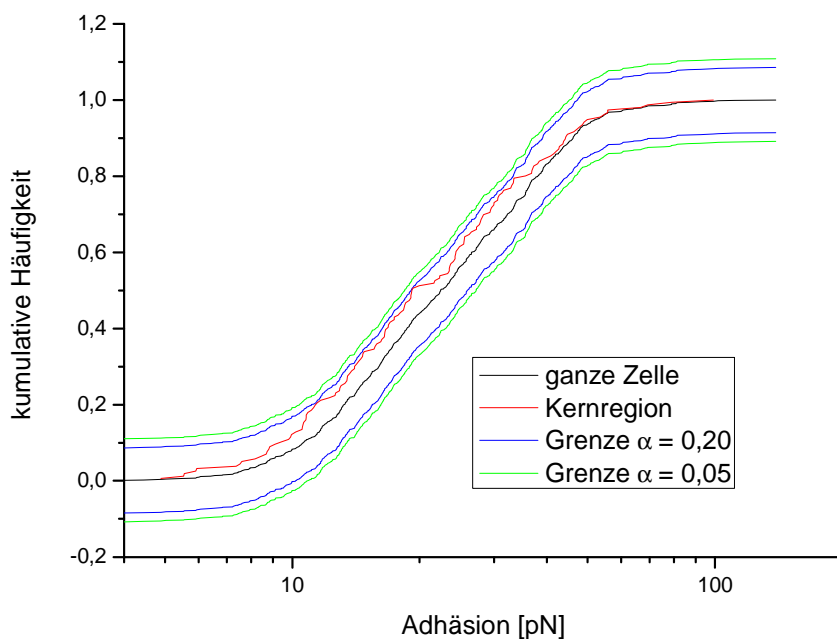


Abb. 52 Statistik der Verteilung der Bindungskräfte von CeO_2 auf der Zelloberfläche und im Areal des Kerns mit maximaler Toleranz bei zwei Signifikanzniveaus α

Diese Ergebnisse können in Einklang mit den schon genannten Modellen der Interaktion mit der Zelloberfläche interpretiert werden. Eine eher unspezifische Bindung der NP an der Membran wäre unabhängig von deren Aufbau und würde eine statistische Verteilung der Bindungsereignisse bedingen. Unter der Annahme, dass bestimmte Membranstrukturen an der Bindung beteiligt sind, ist eine Einschätzung deren Lokalisierung und Größe notwendig. Die Heterogenitäten in dem Aufbau der Membran, die durch eingelagerte Proteine hervorgerufen werden, liegen im Größenbereich von $10 - 50 \text{ nm}^{51}$ und entsprechen damit dem Apex einer nicht funktionalisierten AFM-Spitze oder einem einzelnen NP. Da es schon durch die Kraft

von 200 pN, die nötig ist, um den Kontakt mit der Zellmembran sicher zu stellen, zu einer Indentation und damit zu einem Anstieg der Kontaktfläche kommt, ist eine solche Auflösung praktisch nur schwer zu erreichen. Weiterhin liegen die zu untersuchenden NP in aggregierter Form vor, so dass es zu einer weiteren Vergrößerung der Kontaktfläche kommt. Damit ist es wahrscheinlich, dass in dem Kontaktbereich einer Messung mehrere Membranproteine eingelagert sind, die kollektiv erfasst werden. So repräsentieren die einzelnen F/d-Kurven jeweils einen größeren Bereich der Membran.

Wie aus den zuvor geschilderten Ergebnissen kommen auch Microvilli als Bindungsstellen für die NP in Frage (Kap. 4.2.3). Diese Villi bedecken weite Teile der Zelle und weisen eine Länge von etwa 1 – 3 μm auf. So ist es möglich, dass ein Microvillus die Bindungsereignisse in einem Areal von bis zu 6 μm Durchmesser beeinflusst. Es ist daher anzunehmen, dass sich häufig mehrere solcher Gebiete überschneiden und eine Zuordnung damit erschweren. Eine erhöhte Dichte würde die Bindungswahrscheinlichkeit in diesen Bereichen steigen lassen. Solch ein Verhalten wäre aber nur erkennbar, wenn die Bindung von NP überwiegend an den Microvilli und nur in geringem Maß an der Plasmamembran stattfände, was bislang experimentell nicht belegt ist.

Darüber hinaus können auch ganze Domänen der Membran unterschieden werden, wie sie beispielsweise unter dem Stichwort „Lipid Raft“ diskutiert werden. Diese Areale weisen eine Lipidzusammensetzung auf, die sich im Vergleich zur Umgebung durch einen höheren Anteil an Sphingolipiden und Cholesterol auszeichnet¹⁶⁵ und im Zusammenhang mit bedeutenden zellulären Vorgängen wie der Signaltransduktion oder Endocytose genannt werden.⁴⁴ Hier ist besonders die durch Caveolae vermittelte Aufnahme zu erwähnen,¹⁶⁶ die bereits diskutiert wurde (Kap. 1.2). Auch eine Beteiligung solcher Membrandomänen an der Bindung der NP könnte zu einer heterogenen Verteilung der Bindungskräfte führen. Da für sie ein Durchmesser von 10 – 200 nm angegeben wird,¹⁶⁵ können einige solcher Domänen eine Größenordnung erreichen, die für die hier anzunehmenden Kontaktflächen zwischen NP-Aggregaten und der Zellmembran relevant wird. Jedoch werden die Eigenschaften, Dimensionen sowie die Anzahl der Lipid Rafts in der Zellmembran teilweise kontrovers diskutiert,^{167,168} da biochemische und biophysikalische Techniken zur Untersuchung von dieser Membransturen weiterer Entwicklung bedürfen, um valide Daten nicht nur in Modellmembranen sondern auch in komplexen zellulären Systemen zu erhalten.¹⁶⁹ Das Wissen um die genaue Größe und Anzahl von Membrandomänen sowie die jeweilige Geometrie des Kontaktbereiches zwischen dem NP-Aggregat an der AFM-Spitze und der Zelle ist begrenzt.

Daher ist eine Aussage, ob detektierbar ist, in wie weit Heterogenitäten des Membranaufbaus die Verteilung von Abrisskräften unter den gegebenen Bedingungen beeinflussen, schwer zu treffen. Für die in diesem Projekt untersuchten NP ergibt sich damit, dass sie durch die Produktionsweise und die Testbedingungen weitgehend als Aggregate und Agglomerate vorliegen (Abb. 27, Abb. 42, Abb. 43), die im Vergleich zu einzelnen Primärpartikeln eine stark erhöhte Kontaktfläche mit der Zellmembran aufweisen. Somit waren die Untersuchungen auf diese größeren Strukturen zu fokussieren, um ein realistisches Bild der Interaktion mit den Zellen zu gewährleisten. Am Beispiel der CeO_2 -NP ist gezeigt worden, dass die Bindungskräfte und die Bindungshäufigkeit sich zwischen verschiedenen Regionen der Zelloberfläche nicht unterscheiden.

4.2.5 Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieses Projektes war es, die Interaktionen von Nanopartikeln und tierischen Zellen zu analysieren, um Informationen über die Bindung und Aufnahme in den Organismus zu erhalten. Von großer Bedeutung ist dabei die Charakterisierung der Partikeleigenschaften in den jeweiligen biologischen Medien, da diese sich deutlich von denjenigen der trockenen oder in Wasser dispergierten Partikel unterscheiden. Um möglichst native Bedingungen zu erhalten, wurde in Flüssigkeit gearbeitet und als Methode AFM kombiniert mit optischer Mikroskopie eingesetzt. Darüber hinaus wurden AFM-Messungen getrockneter Proben mit SEM-Abbildungen als komplementärer Technik verglichen.

Die Stabilität der Partikeldispersion wird in wässrigen Medien unter anderem durch das zeta-Potential bestimmt. Der pH-Wert als auch die hohe Ionenstärke in biologischen Puffern führen daher bei den untersuchten NP zur Bildung von Agglomeraten von bis zu mehreren μm Größe. In proteinhaltigen Kulturmedien reduziert sich der Durchmesser der Agglomerate mit steigender Proteinkonzentration auf teilweise unter 100 nm. Die raue Oberflächenstruktur von so inkubierten Hydroxylapatitpartikeln zeigt die Adsorption von Proteinmolekülen an. Diese können zu einer sterischen und elektrostatischen Stabilisierung der Partikel in der Dispersion beitragen. Ein ähnliches Verhalten ist auch bei anderen NP anzunehmen. Sowohl die elektrostatischen Eigenschaften als auch die Modifikation der Partikeloberfläche mit Proteinen sind bei der Analyse der Bindung an Zelloberflächen zu berücksichtigen.

AFM-Abbildungen lebender Zellen zeigen deutlich deren Membranoberfläche sowie darunterliegende Cytoskelettstrukturen. Weiterhin konnte die Bewegungsdynamik der Zellen durch Bilderserien mit dem AFM aufgelöst werden. Um die Bindung von NP zu bestimmten Zeitpunkten zu analysieren, wurden die Zellen chemisch fixiert und solche Bewegungen unterbunden. Mit NP inkubierte Zellen weisen auf der Oberfläche viele Protrusionen auf, deren Mehrzahl eine Höhe von bis etwa 400 nm besitzt, was dem Wert von agglomerierten NP entspricht. Unbehandelte Zellen besitzen deutlich weniger Protrusionen vergleichbarer Höhe, die zelluläre Strukturen wie Microvilli darstellen. Eine Zuordnung ist daher für größere NP-Agglomerate möglich, im Allgemeinen sind jedoch weitere Informationen zur Identifikation nötig, da die Flexibilität der Zellen die erreichbare Auflösung herabsetzt. Dazu wurden fluoreszent markierte Beads untersucht, mit denen eine eindeutige Identifikation realisiert wurde. Durch die Korrelation mit den fluoreszenzmikroskopischen Daten konnten hier auch unterschiedliche Stufen des Aufnahmeprozesses in die Zelle unterschieden werden.

NP sind auch ohne Fluoreszenzmarkierung auf Zelloberflächen anhand ihrer typischen Anordnung klar erkennbar, nachdem die Steifigkeit der Zellen durch Trocknung gesteigert worden ist. Einzelne NP und ganze Microvilli konnten so gut aufgelöst dargestellt werden. Verglichen mit dem AFM wurde durch den Einsatz von SEM die Messdauer um eine Größenordnung reduziert, was diese Technik insbesondere für Partikel ohne Fluoreszenzeigenschaften geeignet macht. Durch beide Methoden wurde eine Bindung der NP an der Zellmembran gezeigt, wobei es häufig zu einer Interaktion zwischen den NP und Microvilli kommt. Eine Konzentration von Rezeptormolekülen in diesen Zellstrukturen, die dem Stoffaustausch mit der Umgebung dienen, macht sie als Bindungsstelle auch für NP wahrscheinlich. Um das genauer zu untersuchen, wurde eine dynamische Inkubationsmethode entwickelt, bei der eine NP-Dispersion an den Zellen vorbeiströmt. So können Bindungsvorgänge selektiver stattfinden, als wenn NP durch Sedimentation in Kontakt zu der Zelloberfläche kommen. Auch hier zeigen die SEM-Daten eine Assoziation zwischen den NP und den Microvilli.

Eine wichtige Frage ist, in wie weit die Interaktion mit den Zellen durch die Eigenschaften der Partikel beeinflusst wird. Zur Messung der Bindungskräfte mit lebenden Zellen wurden NP unterschiedlicher Zusammensetzung ausgewählt. Für CeO_2 , TiO_2 und SiO_2 werden sehr ähnliche Werte zwischen 34 und 38 pN erhalten, was auch für ähnliche Bindungsmechanismen spricht. Elektrostatische Wechselwirkungen auf Basis der zeta-Potentiale, die in Kulturmedium im Gegensatz zu H_2O kaum Unterschiede aufweisen, können eine Erklärung hierfür sein. Mit steigender Kontaktzeit zwischen den funktionalisierten Spitzen und der Zelle steigt die Gesamtkraft, die sich auf mehrere Abrisse verteilt. Diese werden durch das gestaffelte Lösen einzelner Tether von der Spitze hervorgerufen. Das spricht dafür, dass die Bindung zu NP-Agglomeraten nach dem initialen Kontakt an mehreren Stellen aufgebaut und so verstärkt wird. Die Verteilung solcher Bindungsstellen auf der Zelloberfläche wurde anhand von Force-Volume Messungen untersucht. Für CeO_2 -NP zeigt sich, dass die Bindungskräfte über die Zelloberfläche gleichmäßig verteilt sind, insbesondere lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kernregion und anderen Bereichen feststellen. Eine Bindung und auch das Ausbilden von Tethern sind an der gesamten Membran möglich, darüber hinaus ist wie auch anhand der Bilddaten die Beteiligung der schlauchartigen Microvilli gerade an der Tetherentwicklung eine weitere plausible Erklärung.

Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigen deutlich das Potential, das in der Kombination von AFM und Fluoreszenzmikroskopie liegt. Fluoreszente Polymerbeads wie auch anorganische NP sind in verschiedenen Größen und mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen kommerziell erhältlich und stellen das geeignetste Material für Untersuchungen der Bindung und Aufnahme in Zellen dar. Sie erlauben nicht nur die eindeutige Identifizierung in AFM-Abbildungen der Zelloberfläche sondern auch die zeitaufgelöste Verfolgung des Transports innerhalb der Zelle insbesondere durch Konfokale Mikroskopie. Studien haben gezeigt, dass eine Anregung der Probe im Ultraschallbereich solche intrazellulären Partikel aufgrund ihrer mechanischen Heterogenität mittels AFM detektierbar macht.¹³³ Die hier gezeigten Darstellungen von Nucleoli in Zellkern deuten in eine ähnliche Richtung. Nach einer Etablierung eines solchen Systems mit fluoreszenten Partikeln ist eine Erweiterung auf beliebige Nanopartikel möglich. Damit kann eine allgemeine Einsetzbarkeit des AFM für Untersuchungen der Partikel-Bindung und sogar des intrazellulären Transports erreicht werden. Hierin zeigen sich deutliche Vorteile gegenüber den Methoden der Fluoreszenzmikroskopie auf der einen sowie der Elektronenmikroskopie auf der anderen Seite mit ihren jeweiligen Limitierungen.

Die präzise Lokalisierung einzelner Bindungsstellen auf der Zelloberfläche ist im Force-Volume-Mode möglich und wurde zur Vermessung der vollständigen Zelloberfläche eingesetzt. Als nächster Schritt sollte die laterale Auflösung erhöht werden, um in die Dimensionen von Membrandomänen zu gelangen so dass die mikroskopische Heterogenität der Membran durch die Messdaten abgebildet wird. So werden Aussagen über das Bindungsverhalten von Lipidclustern und einzelnen Membranproteinen möglich. Hierzu muss die Größe der Sonde verkleinert werden. Einerseits vermag die AFM-Spitze selbst als Modelpartikel dienen, was den Vorteil einer bekannten und relativ einfach zu beschreibenden Geometrie mit sich bringt und in dieser Arbeit für Vergleichsmessungen genutzt wurde. Hier könnten durch eine Beschichtung Variationen der chemischen Zusammensetzung generiert und das Bindungsverhalten mit dem jeweiligen Material korreliert werden. Um der Situation tatsächlicher NP näher zu kommen, ist die Anbindung einzelner NP über einen Linker

vorzuziehen. Zudem wird damit die Interpretation kraftspektroskopischer Daten einfacher. Eine Verkürzung der Messdauer bei gleichzeitiger Erhöhung der lateralen Auflösung kann durch die Erweiterung um neuere Techniken wie TREC oder PeakForce QNM® erreicht werden.

4.3 Oberflächenstruktur von Bakterienzellen

Die Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung und Klassifizierung von Bakterien ist historisch eng mit lichtmikroskopischen Techniken und Färbemethoden verbunden. So ist die grundlegende Einteilung von Bakterien in gramnegative und grampositive Bakterien aufgrund unterschiedlicher Farbstoffaufnahme durch den Aufbau der Zellwand bedingt. Allerdings wurde diese Struktur wegen der Auflösungsbegrenzung der Lichtmikroskopie erst später durch die Elektronenmikroskopie darstellbar. Nicht nur deshalb ist die EM heute für die Aufklärung der Struktur von Bakterien unverzichtbar und steht daher am Anfang der hier dargestellten Ergebnisse.

Bedingt durch das zugrunde liegende Messprinzip erfordert EM verschiedene präparative Schritte, die besonders bei biologischen Proben zu Artefakten führen können. Daher werden hier Vergleiche verschiedener SEM Techniken und der komplementären Methode der Rasterkraftmikroskopie angestellt, die hochaufgelöste Darstellungen auch der lebenden Bakterien unter nativen Bedingungen erlaubt. Auf diese Weise wird auf die für konventionelle SEM-Abbildungen notwendigen Präparationsschritte (Fixierung, Dehydrierung, Trocknung, Evakuierung und Metallbeschichtung) sukzessive verzichtet, so dass eine systematische Korrelation der beobachteten Oberflächenstruktur der Bakterien mit den jeweiligen Messbedingungen möglich ist. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf faltenartigen Ausstülpungen der äußeren Membran, die in EM-Abbildungen weite Bereiche der Bakterien bedecken und oft als Artefakte infolge eines Schrumpfungsprozesses der Bakterien während der Trocknung interpretiert werden. Anhand der AFM-Abbildungen lassen sich jedoch ähnliche Strukturen auch auf lebenden Bakterien ausmachen, aus denen sich die Ausstülpungen entwickeln können.

Für AFM-Untersuchungen ist die Immobilisierung der Bakterien auf einer Oberfläche besonders bei Abbildungen in Flüssigkeit von entscheidender Bedeutung für die Qualität der Bilder. Diese Aufgabe wird hier nach einer einfach durchführbaren Methode realisiert und anhand hochaufgelöster Abbildungen lebender Zellen evaluiert.

Als Modellorganismus für die Untersuchungen wurde das gramnegative alpha-Proteobakterium *S. meliloti* gewählt. Um mögliche biologische Ursachen der beschriebenen Oberflächenstrukturen zu evaluieren, sind zusätzlich zu dem Wild-Typ 2 Mutanten analysiert worden, die maßgebliche Oberflächenmoleküle nicht oder nur in einer verkürzten Variante synthetisieren.

4.3.1 SEM-Untersuchungen

Für konventionelle SEM-Abbildungen werden die Bakterien chemisch fixiert, getrocknet und mit Metall beschichtet im Vakuum untersucht. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von in dieser Weise präparierten *S. meliloti* zeigen 1 – 3 μm lange stäbchenförmige Zellen mit einem Durchmesser von ca. 0,5 μm . Die Zellen weisen eine raue Oberfläche auf, die weitgehend mit wulstartigen länglichen Strukturen bedeckt ist (Abb. 53). Die Länge der Strukturen beträgt 92 ± 32 nm, die Breite 29 ± 12 nm (Mittelwert \pm Standardabweichung). An den seitlichen Bereichen der Bakterien ist im Profil erkennbar, dass es sich um nach außen gerichtete Falten handelt. Ähnliche Strukturen sind unter vergleichbaren Bedingungen für verschiedene gramnegative Bakterien beschrieben worden.¹⁷⁰ Ein optischer Vergleich mit den dort publizierten SEM-Abbildungen von *E. coli* (die Dimensionen der Strukturen wurden

nicht angegeben) zeigt auch eine quantitative Übereinstimmung mit den an *S. meliloti* durchgeführten Untersuchungen.

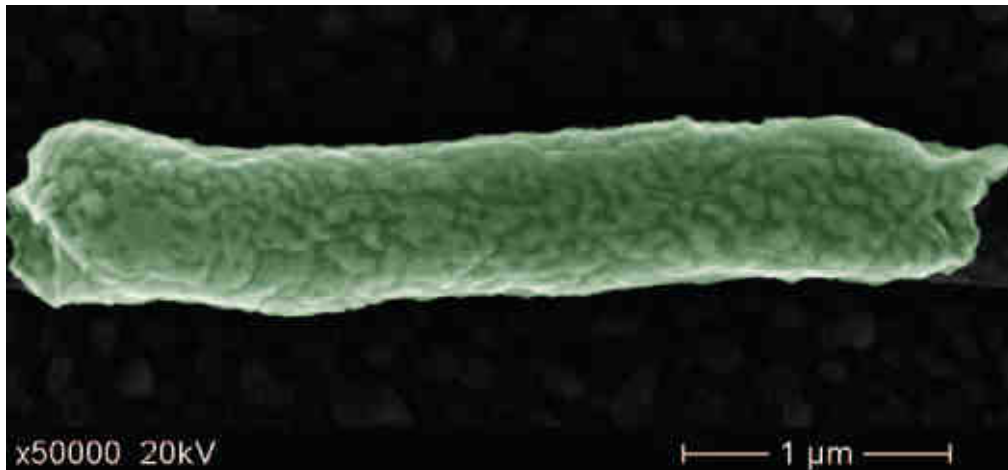


Abb. 53 Abbildung von *S. meliloti* durch ein konventionelles SEM. Probe mit 12 nm Goldbeschichtung. Bakterien zeigen wulstartige Oberflächenstrukturen.

Da die Dicke der Metallbeschichtung der Probe im Größenbereich der zu charakterisierenden Texturen liegt und zudem Inhomogenitäten der Schichtdicke zu Artefakten führen könnten, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen mit einem neu entwickelten extrem hochauflösenden SEM (im Folgenden XHR SEM bezeichnet) durchgeführt. Für diese Messungen spielt insbesondere die Fähigkeit, Proben ohne die übliche Metallbeschichtung abzubilden, eine entscheidende Rolle. Hierzu wurde die Energie des Elektronenstrahls für die Untersuchung kurz vor Erreichen der Probe auf 2 keV reduziert. Auf den so gewonnenen Abbildungen zeigen die Bakterien auch nach mehrfachen Scans eine ähnliche Form wie die mit einem konventionellen SEM untersuchten Zellen. Das bestätigt, dass die vergleichsweise empfindlichen biologischen Materialien auch mit dieser Technik ohne signifikante Beschädigungen durch den Elektronenstrahl untersucht werden können.

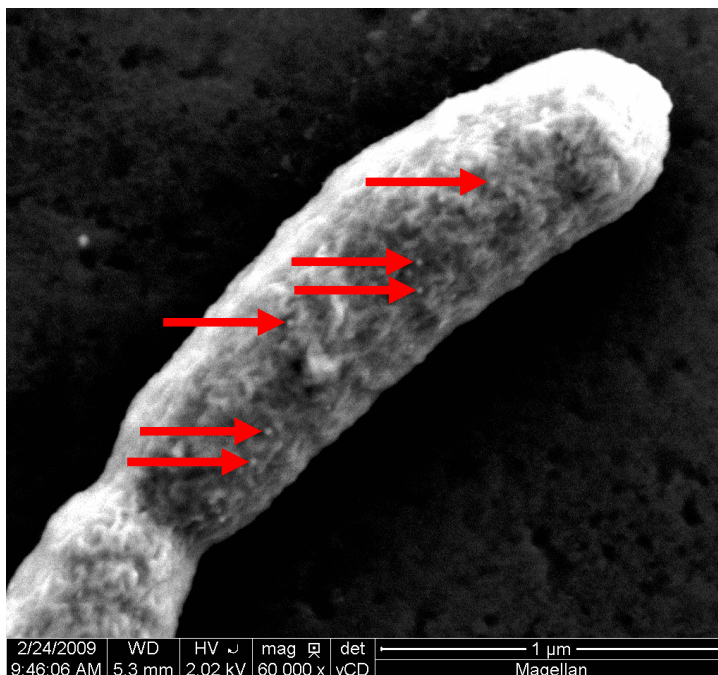


Abb. 54 Abbildung von *S. meliloti* durch ein XHR SEM. Probe ohne Metallbeschichtung. Neben wulstartigen Oberflächenstrukturen sind einzelne punktförmige Strukturen erkennbar (Pfeile).

Analysiert man die Oberfläche im Detail (Abb. 54), ist zu erkennen, dass auch hier faltenartige Protrusionen vorhanden sind. Sie weisen eine Länge von 80 ± 27 nm und eine Breite von 18 ± 5 nm auf. Damit sind die Dimensionen im Vergleich mit den SEM-Daten um ca. 11 nm kleiner. Weiterhin fällt auf, dass die Dichte dieser wellenförmigen Strukturen auf der Bakterienoberfläche größer ist, als sie bei konventionellen SEM-Untersuchungen festgestellt wurde. Beide Befunde legen nahe, dass es aufgrund der üblicherweise für SEM verwendeten Metallbeschichtung zu Veränderungen der Probe kommt, die die Analyse beeinflussen. Durch die Metallschicht erscheinen einzelne Protrusionen größer. Zudem kann man annehmen, dass dicht nebeneinander liegende Strukturen wie die für XHR SEM beschriebenen feinen Muster unter der aufgetragenen Schicht teilweise nicht mehr als einzelne Elemente dargestellt werden, sondern zu einer Einheit verschmolzen erscheinen.

Diese Interpretation steht unter dem Vorbehalt, dass beide verglichenen SEM-Techniken vor allem die Topographie der Probe darstellen. Die SEM-Bilder werden auf Basis der detektierten Sekundärelektronen erzeugt, die vor allem aus den oberen Bereichen der Goldschicht stammen. Sie geben damit ein Abbild der Topographie der Probe. Bei den mittels XHR SEM untersuchten unbeschichteten Proben entfällt die relativ ausgeprägte Wechselwirkung des Elektronenstrahl mit einer massereichen Metallschicht hoher Elektronendichte. Die Eindringtiefe in die organische Matrix ist somit höher, kann aber durch die vergleichsweise geringe Energie der Elektronen kontrolliert werden. Der verwendete Detektor (vCD) ist besonders für rückgestreute Elektronen niedriger Energie optimiert, die aus Eindringtiefen von einigen nm stammen können. Damit sind mit dieser Methode Darstellungen auch tiefer gelegener Strukturen der Bakterienhülle möglich. Hier kommen beispielsweise das Peptidoglycan sowie die Cytoplasmamembran in Betracht, die (bei *E. coli*) in einem Abstand von ca. 5 nm bzw. 19 – 24 nm unter der äußeren Membran liegen.^{26,171} Für die hier als Falten beschriebenen Strukturen kann im folgenden Abschnitt anhand von AFM-Untersuchungen allerdings dargelegt werden, dass es sich wie bereits angenommen tatsächlich um Protrusionen auf der Zelloberfläche handelt. Die anregenden Elektronen dringen auch in die Protrusionen selbst ein, so dass rückgestreute Elektronen auch aus dem Inneren dieser Strukturen stammen können. Damit besteht die Möglichkeit, dass die Breite dieser Protrusionen zu klein bestimmt wird. Auch in dieser Hinsicht zeigen die AFM-Abbildungen, dass beide Methoden zu ähnlichen Ergebnissen kommen, da die dort gemessene Breite nur 8 nm größer ist, was durch den Einfluss der Spitzengeometrie erklärbar ist. Damit ist klar, dass XHR SEM hier vor allem Elektronen aus oberflächennahen Schichten detektiert und somit die Topologie der Probe darstellt.

Eine eingehende Diskussion möglicher Ursachen dieser Strukturen setzt die Einbeziehung insbesondere der in Flüssigkeit und damit unter weitgehend physiologischen Bedingungen gewonnenen Daten voraus und findet daher im Anschluss an die Darstellung der mittels AFM erhaltenen Ergebnisse statt.

4.3.2 AFM-Untersuchungen

Die verwendeten SEM-Techniken liefern detaillierte Darstellungen der Bakterienoberfläche, sind aber hinsichtlich der Probenpräparation aufwendig. Zudem wird an Beispiel der XHR SEM-Bilder deutlich, dass eine Interpretation der Daten nicht immer eindeutig ist. Die Kombination mit einer komplementären Technik wie AFM zur Untersuchung der Bakterienoberfläche bietet nicht nur die Möglichkeit, die elektronenmikroskopischen Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, sondern auch Unsicherheiten in der Interpretation zu beseitigen, die bei Verwendung einer einzelnen Technik verbleiben

können. Hinsichtlich der Probenpräparation ist mit der AFM-Technik eine große Flexibilität gegeben, die bis zur Untersuchung der Bakterien im nativen Zustand reicht, wie nun dargestellt wird.

Abbildungen in Trockenheit

Nachdem die Auswirkungen einer Metallbeschichtung auf die Oberflächenstrukturen der Bakterien elektronenmikroskopisch analysiert wurden, wird nun die Frage behandelt, ob und in welcher Weise ein Vakuum, das für die EM notwendig ist, die Bakterienoberfläche beeinflusst. Auch ein Vergleich der eingesetzten mikroskopischen Techniken wird angestellt. Dazu wurden die Bakterien in gleicher Weise behandelt, wie für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (fixiert, getrocknet), jedoch bei Umgebungsbedingungen abgebildet. Die AFM-Daten werden zumeist als 3D-Darstellung der Topographie präsentiert, da in dieser Form kleinere Oberflächenstrukturen deutlicher erkennbar sind, als es bei der gebräuchlichen zweidimensionalen Ansicht mit farbkodierten Höheninformationen möglich ist.

Aus der Abb. 55 geht hervor, dass die Oberfläche der Bakterien mit länglichen Protrusionen bedeckt ist, die eine gewundene und flach auf der Oberfläche liegende Form aufweisen. Ihre Dichte ist so groß, dass keine unbedeckten Bereiche der Zelloberfläche erkennbar sind. Die Höhe beträgt $12,1 \pm 4,9$ nm, die Länge 72 ± 28 nm und der laterale Durchmesser 26 ± 6 nm. Damit weisen sie ähnliche Dimensionen auf, wie es elektronenmikroskopisch festgestellt wurde. Man kann daher davon ausgehen, dass die mittels XHR SEM dargestellten Falten sich wie bereits erwähnt auf der Oberfläche der Bakterien befinden und keine tiefer liegenden Strukturen darstellen. Dies kann aufgrund der vergleichbar hohen Dichte auf der Oberfläche für alle der dort beschriebenen faltenartigen Strukturen angenommen werden.

Vergleicht man die Werte mit den Ergebnissen des XHR SEM, wird mittels AFM ein um 8 nm größerer lateraler Durchmesser bestimmt. Das ist aufgrund der Faltung von Spitzen- und Probengeometrie erklärbar (Krümmungsradius der Spitze laut Hersteller < 10 nm). Bei der hohen Dichte der Protrusionen auf der Oberfläche kann dieser Effekt darüber hinaus dazu führen, dass die AFM-Spitze Kontakt zu benachbarten Protrusionen erhält, bevor sie einer absteigenden Flanke bis zum Boden gefolgt ist. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Höhe der Protrusionen geringfügig größer sein kann.

Anhand der mit (XHR) SEM und AFM durchgeführten Messungen wird deutlich, dass die zu beobachtenden Unterschiede der Abbildungen durch die Eigenschaften der jeweiligen Techniken erklärt werden können. Die Bakterien zeigen prinzipiell ähnliche Oberflächenstrukturen, so dass man davon ausgehen kann, dass die getrockneten Bakterien durch ein Vakuum während der Messung nicht signifikant verändert werden. Durch das Sputtern können bereits vorhandene Strukturen lediglich in der scheinbaren Größe verändert werden. Es ist bekannt, dass feine Strukturen biologischer Proben durch ein starkes Vakuum in Mitleidenschaft gezogen werden können. Solche Effekte sind durch eine geeignete chemische Fixierung der Proben zu vermeiden.¹⁷²

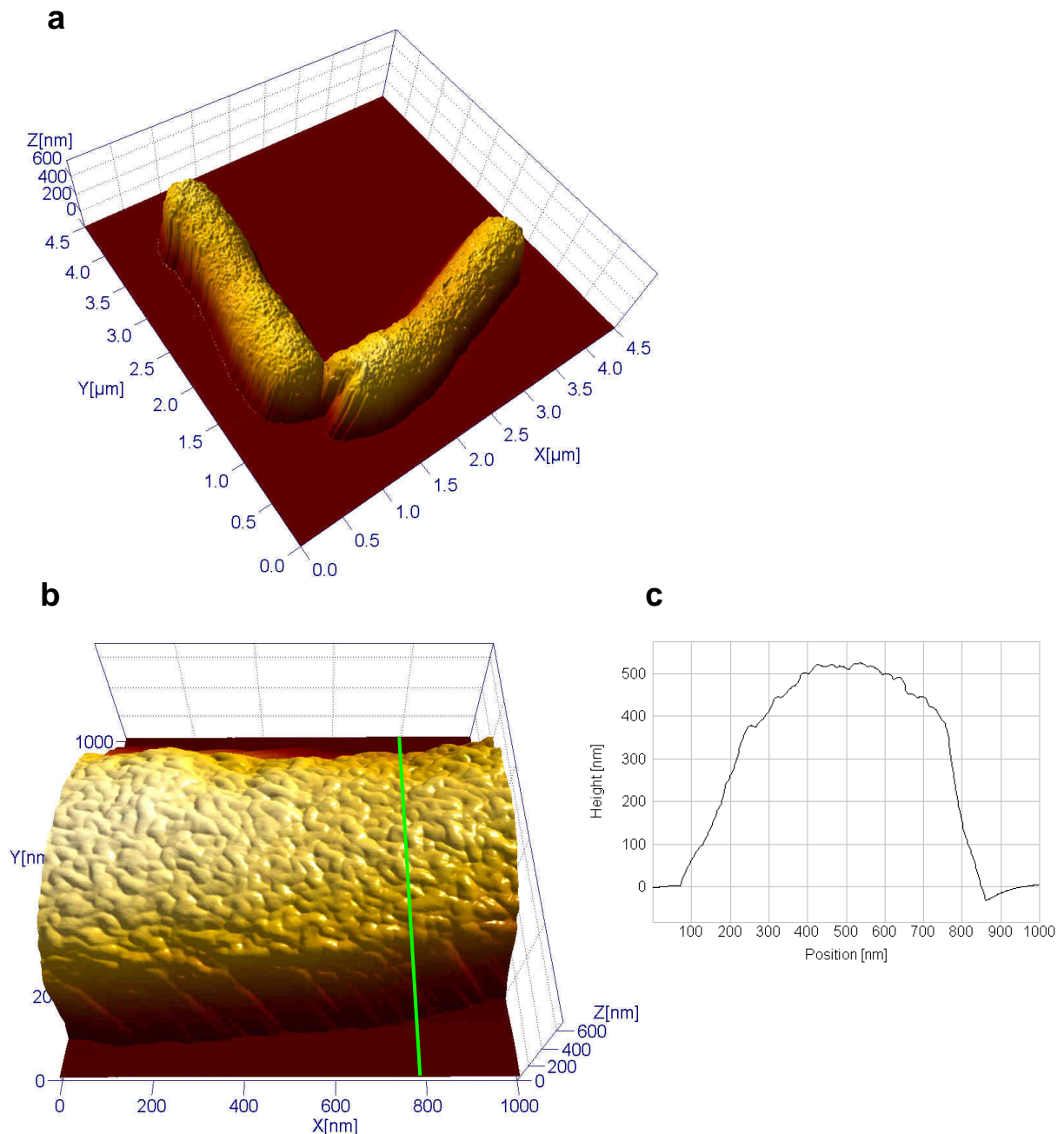


Abb. 55 Topographisches AFM-Bild von *S. meliloti*. Probe getrocknet, Messung an Luft (a). Wulstartige Ausstülpungen bedecken Zelloberfläche vollständig (b), Höhenprofil entlang grüner Linie (c)

Abbildungen in Flüssigkeit

Da bakterielle Zellen zu 70 % aus Wasser bestehen und auch in feuchter Umgebung wachsen, ist bei einer Trocknung mit deutlichen strukturellen Veränderungen zu rechnen. Um diese möglichst gering zu halten, sind vielfältige Methoden entwickelt worden (Kap. 4.2.3). Besonders da die bisher beschriebenen Falten der Bakterienoberfläche oft als Trocknungsartefakte interpretiert werden, kommt der Analyse der nun dargestellten Ergebnisse besondere Bedeutung zu.

Als Vorbereitung der Trocknungsprozedur werden Zellen chemisch fixiert, wodurch die mechanische Stabilität erhöht wird. Zumeist kommt eine Quervernetzung der freien

Aminogruppen von Proteinen zum Einsatz, die in dieser Studie durch Glutaraldehyd und Paraformaldehyd bewirkt wird. Die Bakterien wurden in PBS-Puffer abgebildet, einem weit verbreiteten Medium für biologische Präparationen.

Die Bakterien zeigen auch in Flüssigkeit eine raue Oberfläche (Abb. 56). Diese ist bedeckt mit Protrusionen, die einen annähernd runden Umriss aufweisen, wie aus hochaufgelösten Abbildungen ersichtlich ist (Abb. 56b). Die Höhe beträgt $4,7 \pm 2,7$ nm und der laterale Durchmesser 33 ± 8 nm. Ähnlich wie bei den getrockneten Bakterien ist die Zelloberfläche vollständig mit diesen Protrusionen bedeckt.

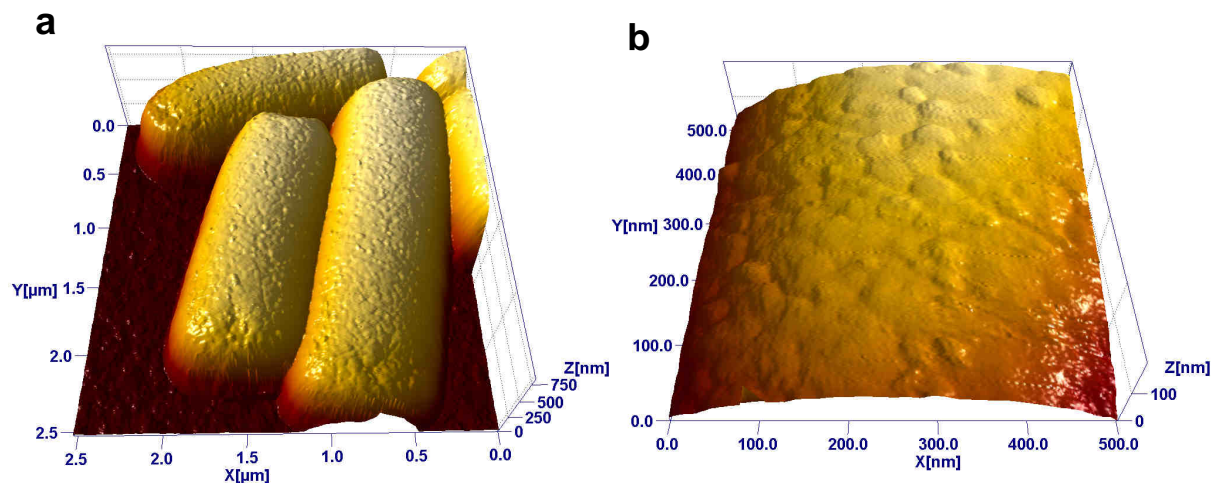


Abb. 56 AFM-Topographie von *S. meliloti* gemessen in PBS nach Fixierung (a). Die Zelloberfläche ist bedeckt mit zumeist runden Protrusionen (b).

Bei der chemischen Fixierung werden zelluläre Strukturen kovalent verknüpft wobei es zu Denaturierungen von Proteinen kommen kann. Es ist also abschließend zu klären, ob die Protrusionen gegebenenfalls auf dabei entstehende Aggregate zurückzuführen sind. Dazu wurden lebende Bakterien ohne weitere Behandlung vermessen. Um den Einfluss der Umgebungsbedingungen zu minimieren, fanden diese Untersuchungen in dem entsprechenden Kulturmedium (VMM) statt.

Die Analyse der Bilder zeigt, dass die Oberfläche lebender Bakterien auch unter weitgehend physiologischen Bedingungen mit Protrusionen bedeckt ist (Abb. 57a). Die Form der Erhebungen ist rundlich, wobei die Höhe $3,9 \pm 1,7$ nm und der laterale Durchmesser 28 ± 6 nm beträgt. Damit gleichen sie den auf fixierten Zellen beobachteten Strukturen. Der Unterschied hinsichtlich deren Dimensionen ist gering und kann in Zusammenhang mit dem osmotischen Druck verstanden werden, da die jeweils gelösten Stoffe in PBS 300 mosmol/L und in VMM 153 mosmol/L ausmachen. Es ist daher möglich, dass die Zellen in PBS Wasser abgeben und damit der periplasmatische Raum geringfügig schrumpft, was zu einem Anwachsen der Protrusionen führt. Zur Überprüfung dieser These wurden die Bakterien auch in H_2O vermessen, in dem die Erhebungen kleiner sein sollten, als es in Kulturmedium der Fall ist, da hier mit einem Anschwellen der Zellen zu rechnen ist. So ist beispielsweise der Turgor Druck von *P. aeruginosa* in H_2O 10fach größer als in Kulturmedium.²⁴ Wie in Abb. 57b zu erkennen ist, sind die Oberflächenstrukturen ebenfalls vorhanden, die Auswertung zeigt, dass sie eine Höhe von $2,0 \pm 0,7$ nm und einen lateralen Durchmesser von 29 ± 10 nm aufweisen. Damit sind sie um 1,9 nm flacher als in Kulturmedium, was den Einfluss der Osmolarität belegt.

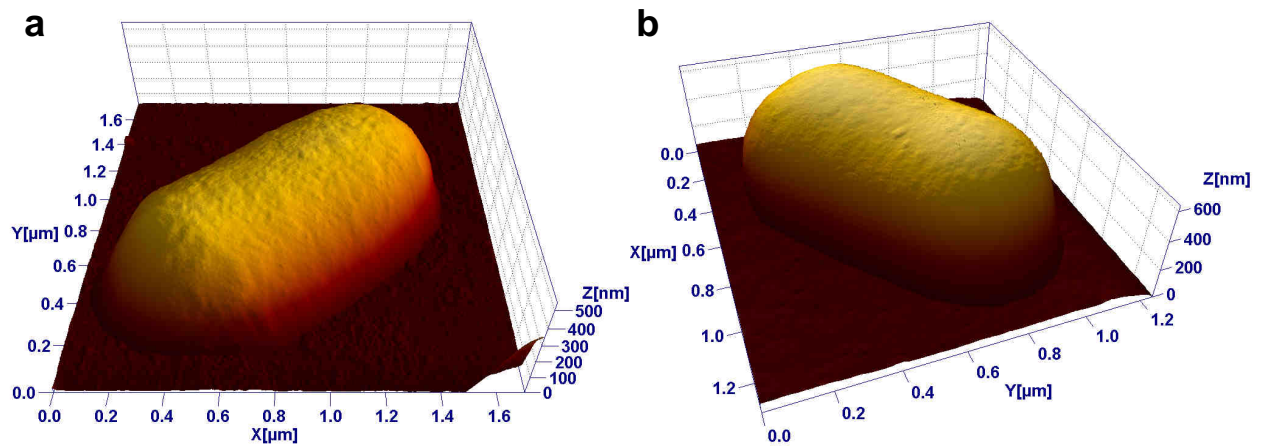


Abb. 57 AFM-Topographie von lebenden *S. meliloti*. In Kulturmedium (a) sind die Protrusionen der Oberfläche größer als bei Bakterien in einer Umgebung geringerer Osmolarität wie hier in H₂O (b)

Für AFM-Untersuchungen in Flüssigkeit ist die Immobilisierung der Proben von großer Bedeutung. Während die zuvor beschriebenen tierischen Zellen adhären auf der jeweiligen Oberfläche anwachsen, werden die Bakterien in einer Suspension kultiviert und erst für die Messung auf eine Oberfläche gebracht. Neben einer mechanischen Immobilisierungstechnik in Filterporen wird zu diesem Zweck oft eine elektrostatische Anbindung vermittelt durch positiv geladenes Polylysin eingesetzt.¹⁷³ In dieser Arbeit wurde stattdessen Polyethylenimin verwendet, das in gleicher Weise über positiv geladene Aminogruppen verfügt. Im Gegensatz zu dem aus Aminosäuren aufgebauten Polylysin ist dieses Polymer deutlich preiswerter und die Präparation mit vergleichbarem Aufwand verbunden. Für modifiziertes PEI wurde eine bakterizide Wirkung beschrieben, welche allerdings auf hydrophoben Substituenten der Aminogruppe beruht,¹⁷⁴ die in der hier verwendeten Substanz nicht vorhanden sind. Andere Arbeiten in dieser Gruppe belegen für das eingesetzte PEI an verschiedenen Stämmen von *S. meliloti* die Viabilität der Bakterien durch time lapse fluorescence imaging (TLFI) Untersuchungen.¹⁷⁵ Das verdeutlicht, dass die Bakterien unter den gewählten Umgebungsbedingungen lebensfähig sind und Wachstum zeigen. Damit ist PEI für die Immobilisierung der Bakterien eine vergleichbare und preiswertere Alternative zu dem häufig verwendeten Polylysin.

In Flüssigkeit kommen bei AFM-Untersuchungen oft Spitzen aus Siliziumnitrid zum Einsatz. Diese weisen bedingt durch die Herstellung in der Regel eine pyramidale Form mit einem halben Öffnungswinkel von ca. 35° auf. Auch wenn die Spitze im Bereich weniger hundert Nanometer geschärft ist und damit in diesem Teil ein kleiner Öffnungswinkel erreicht wird, kann es an den Seiten der Spitze zum Kontakt mit der Probe kommen, vor allem, wenn diese hohe und steile Flanken aufweist. Hieraus können insbesondere bei der Abbildung von Bakterien, die eine Höhe von ca. 400 – 500 nm erreichen Artefakte entstehen.¹⁷⁶ Um solche Störungen so weit als möglich zu vermeiden, wurden für diese Untersuchungen Cantilever aus Siliziumnitrid eingesetzt, die über Siliziumspitzen verfügen. Diese sind deutlich länger als Spitzen aus Siliziumnitrid und weisen über größere Bereiche ein hohes Aspektverhältnis auf. Zudem ähneln ihre Spitzengeometrie und der Spitzenradius dem von Siliziumspitzen, welche für die Messungen in Luft verwandt werden. Damit kann eine möglichst gute Vergleichbarkeit der gemessenen Daten an Luft und in wässrigem Medium garantiert werden. Weiterhin ist der Hebelarm mit ca. 38 μm Länge kürzer als andere kommerziell erhältliche Pendants und weist mit 26 – 30 kHz eine vergleichsweise hohe Resonanzfrequenz in Wasser auf. Da die Federkonstante bei 0,1 N/m liegt und sich damit eher im unteren Bereich vergleichbarer Cantilever für den AC-Mode (z.B. Bruker NP) befindet, sind relativ schonende Bedingungen für die Probe zu erreichen. Weiterhin wird die Probe bei dieser

Anregungsfrequenz ein Vielfaches häufiger von der Spitze abgetastet, was der Scangeschwindigkeit und der Bildqualität zugute kommt.

Die hier beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass mit den eingesetzten Techniken hoch aufgelöste Darstellungen der Bakterienoberfläche auch in wässrigem Medium erreicht wurden. Besonders markant wird das an einigen Abbildungen des Wild-Typs (Rm2011) sowie des Stamms Rm6963, welche Oberflächenstrukturen zeigen, die signifikant kleiner sind, als die bislang beschriebenen Protrusionen. Die Höhe und der laterale Durchmesser betragen für den Stamm Rm2011 $2,0 \pm 0,6$ nm und 12 ± 3 nm (Abb. 58a) sowie für Rm6963 $1,3 \pm 0,5$ nm und 14 ± 4 nm (Abb. 58b). Zudem handelt es sich hier um einzelne Einheiten, die sich im Unterschied zu den beschriebenen Protrusionen nicht direkt an benachbarte Einheiten anschließen. Daher ist anzunehmen, dass es sich um prinzipiell unterschiedliche Strukturen handelt. In der äußeren Membran finden sich verschiedene eingelagerte Proteine, die beispielsweise Poren für den Stoffaustausch bilden. Diese Outer Membrane Proteins (Omp) sind oft in Form eines Hohlzylinders (beta-barrel) aufgebaut, der einen Durchmesser von 14 - 40 Å aufweist.¹⁷⁷ Der extrazelluläre Bereich des in *E. coli* häufig vorkommenden OmpF ragt um $1,1 \pm 0,2$ nm aus der Membran heraus, wie mittels AFM an rekonstruierten Membranproben festgestellt wurde.³¹ Dieser Wert liegt im Bereich der hier auf intakten Zellen gemessenen Daten, was zeigt, dass es sich bei den auf lebenden Bakterien erkennbaren Strukturen um einzelne Membranproteine handeln kann.

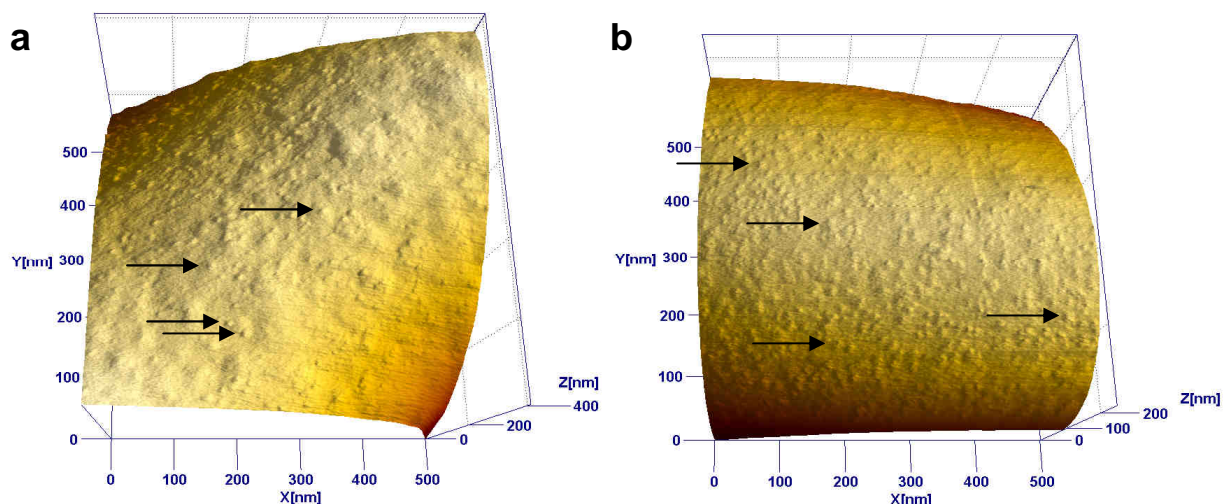


Abb. 58 Hochaufgelöste AFM-Topographie von lebenden *S. meliloti* gemessen in Kulturmedium. Kleine Protrusionen (einige davon markiert) auf der Oberfläche können einzelne Proteine (wie Omp) darstellen. Wild-Typ Stamm Rm2011 (a) und Mutante Rm6963 mit defektem LPS (b)

Einfluss verschiedener Membranbestandteile

Die Untersuchungen an *S. meliloti* haben gezeigt, dass die Zelloberfläche nicht nur in SEM-Abbildungen deutliche Protrusionen aufweist. Diese sind in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen unterschiedlich stark ausgeprägt, aber auch für lebende Bakterien durch AFM nachweisbar. Damit ist eine biologische Ursache anzunehmen, die durch die Struktur der Bakterienhülle gegeben ist. Insbesondere die äußere Membran und ihr molekularer Aufbau werden anhand von zwei Mutanten untersucht. Bei dem Stamm Rm0540 ist die Synthese von Exopolysacchariden gestört. Diese Kohlenhydratketten bilden eine mit der Bakterienoberfläche assoziierte Schicht, sind aber nicht kovalent daran gebunden und können

daher auch in das umgebende Medium abgegeben werden. Die zweite Mutante Rm6963 verfügt über verkürzte Lipopolysaccharid-Strukturen. Diese sind integraler Bestandteil der äußeren Membran, wobei ein flexibler Polysaccharid-Teil in die umgebende Flüssigkeit hineinreicht. Beide Moleküle beeinflussen daher die Beschaffenheit der Oberfläche von Bakterien und können für die hier charakterisierten Strukturen mitbestimmend sein. Durch die Untersuchung der Mutanten wird der jeweilige Einfluss von EPS und LPS analysiert.

Das von *S. meliloti* gebildete Exopolysaccharid besteht aus einer repetitiven Abfolge von Octasacchariden, die jeweils eine kurze Seitenkette aufweisen.¹⁷⁸ Aufgrund ihrer hydrophilen Natur sind sie in der Lage, Wasser zu binden und man kann annehmen, dass sie so auf der Oberfläche der Bakterien eine diffuse und mechanisch flexible Schicht bilden. Bakterien, denen diese Exopolysaccharide fehlen (ExoY⁻), weisen auf ihrer Oberfläche Protrusionen auf, die wie bei dem Wild-Typ einen runden Querschnitt besitzen (Abb. 59). Bei lebenden Zellen abgebildet in PBS wurde eine Höhe von $9,0 \pm 6,5$ nm und ein lateraler Durchmesser von 45 ± 8 nm gemessen, womit die Höhe die des Wild-Typs um das Doppelte übertrifft. Die Differenz zu dem in Trockenheit gemessenen Wert von 12,1 nm ist mit 3,1 nm vergleichsweise gering. Man kann daher annehmen, dass eine Schicht dieser Polysaccharide auf der Oberfläche der Bakterien darunterliegende Strukturen überdeckt. Damit würde der Zugang für die AFM-Spitze erschwert und Höhenmessungen gegebenenfalls gestört. Da Exopolysaccharide nicht fest an der Bakterienoberfläche gebunden sind, können sie durch die Präparationsschritte, die einer Trocknung vorangehen entfernt werden. Das kann dazu beitragen, dass in Trockenheit gemessene Protrusionen deutlich höher sind, als es in wässrigem Medium der Fall ist.

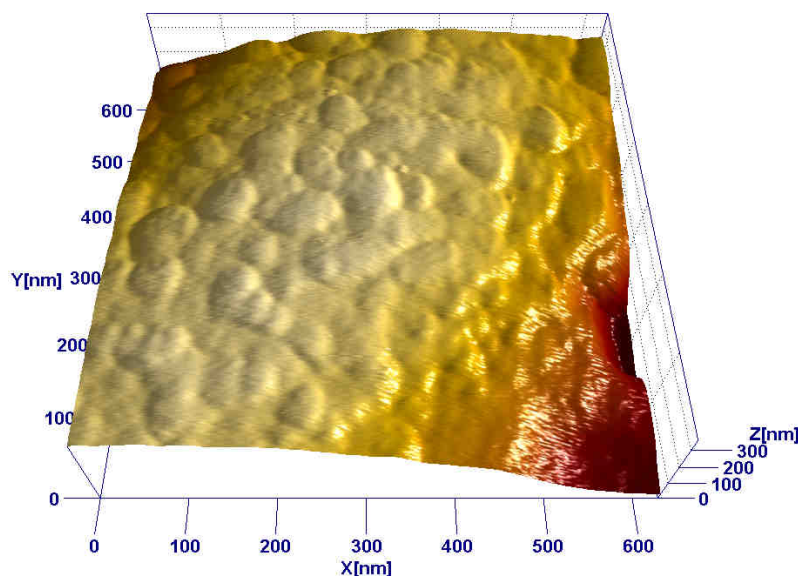


Abb. 59 AFM-Topographie von lebenden *S. meliloti* (Rm0540) gemessen in PBS

Im Unterschied zu Exopolysacchariden sind Lipopolysaccharide integrale Bestandteile der äußeren Membran aller gramnegativen Bakterien. Sie sind dort ausschließlich im äußeren Monolayer zu finden, wo sie große Bereiche der Membranfläche (in *E. coli* ca. $\frac{3}{4}$) ausmachen.¹¹ Daher sind Mutationen, die zu einem völligen Fehlen dieser Moleküle führen letal für die Zelle. Der untersuchte Stamm Rm6963 verfügt über LPS-Strukturen, deren Lipid A und O-Antigen-Bereiche intakt sind, das dazwischen liegende Oligosaccharid der Core-Region ist verkürzt.¹⁷⁹

Bakterien, die diese Mutation tragen (Abb. 58b), zeigen in Kulturmedium Protrusionen auf der Oberfläche, deren Höhe mit $1,6 \pm 0,6$ nm um 2,3 nm niedriger ist, als bei dem Wild-Typ. Für beide Stämme bleiben die Werte jedoch unter der Länge gestreckter LPS-Moleküle (*E. coli* 6–45 nm,²⁸ *P. aeruginosa* 40 nm²⁵) zurück. Lipid A und Core-Region machen jeweils ca. 2,5 nm aus, der größte Teil der Länge des LPS geht auf die Kohlenhydratketten des O-Antigens zurück.²⁸ Diese nehmen wie auch die Exopolysaccharide in wässrigem Medium keine geordnete dreidimensionale Form an, sondern befinden sich dauerhaft in Bewegung, wie Modellrechnungen gezeigt haben. AFM-Messungen an extrahiertem LPS von *P. aeruginosa* in wässrigem Medium ergeben eine Höhe von 12 nm für einen Bilayer. Beveridge kommt daher zu dem Schluss, dass mit einem AFM in wässriger Umgebung lediglich Lipid A und Core-Region vermessen werden können, da die Fluktuationen der übrigen Oligosaccharide zu schnell verlaufen.²⁵ In Anbetracht der Höhe der für Rm2011 beschriebenen Protrusionen von 3,9 nm ist denkbar, dass es sich dabei um LPS-Patches handelt. Diese Interpretation wird gestützt durch die reduzierte Höhe bei Rm6963, da hier die Core-Region verkürzt ist. Die Anordnung von LPS in zusammenhängenden Bereichen wurde an *E. coli* gezeigt,²⁸ so dass ein vergleichbares Verhalten für *S. meliloti* wahrscheinlich ist.

4.3.3 Diskussion

Die SEM- und AFM-Untersuchungen zeigen, dass die Bakterienoberfläche nicht nur nach Trocknung sondern auch bei lebenden Zellen unter weitgehend nativen Bedingungen Protrusionen aufweist, so dass grundsätzlich eine natürliche Ursache für das Vorhandensein dieser Strukturen anzunehmen ist. Im Folgenden werden mögliche biologische Ursachen erläutert. Anschließend wird diskutiert, wie eine Entwicklung der in Trockenheit beobachteten Strukturen auf dieser Basis und unter Einbeziehung der weiteren präparativen Prozeduren denkbar ist.

Protrusionen: Natürliche Ursachen

Für die in Flüssigkeit auftretenden Protrusionen auf der Zelloberfläche kommen mehrere Erklärungsmodelle in Frage, die durch die biologischen Eigenschaften der Bakterienhülle bestimmte werden:

- a) Die in Flüssigkeit auftretenden rundlichen Protrusionen können durch punktuellen Druck auf die Membran hervorgerufen werden. Im Periplasma zwischen innerer und äußerer Membran befindet sich eine große Anzahl an partikulären Strukturen von etwa 6 – 10 nm Durchmesser, bei denen es sich wahrscheinlich um Proteine oder Proteinkomplexe handelt.¹⁸⁰ Da es verbindende Strukturen wie z.B. Lipoproteine zwischen äußerer Membran sowie Peptidoglycan und innerer Membran gibt,²⁹ ist es denkbar, dass die im Periplasma befindlichen Partikel gegen die OM gedrückt werden und diese entsprechend deformieren. Die Größe der Protrusionen wäre in diesem Fall abhängig vom Durchmesser der darunter liegenden Partikel sowie dem Ausmaß, in dem die Membran diese umschließt. Übersteigt die Osmolarität des Mediums diejenige des Cytoplasmas oder Periplasmas der Bakterien, geben diese Wasser nach außen ab und ihr Volumen verringert sich. Da Lipidmembranen im Gegensatz zum Peptidoglycan nur eine geringe laterale Elastizität besitzen von etwa 2 – 5 %, ²⁰ könnte sich die OM unter diesen Bedingungen enger um die im Periplasma liegenden Partikel schließen, wodurch deren Konturen deutlicher

hervortreten würden. Insbesondere bei einer Trocknung der Zellen wäre ein solches Verhalten zu erwarten. Die hier beschriebenen Ergebnisse können in dieser Weise interpretiert werden, da die Höhe der Protrusionen von $3,9 \pm 1,7$ nm in Kulturmedium auf $12,1 \pm 4,9$ nm bei getrockneten Zellen ansteigt. Es wird dabei allerdings von einer weitgehend homogenen Membran ausgegangen, die selbst keine nennenswerten Unebenheiten aufweist. Die OM von Bakterien unterscheidet sich jedoch in dieser Hinsicht von einfachen Doppelschichten aus Phospholipiden, so dass diese Eigenschaft der Membran in Teilen nicht gegeben ist, wie im Folgenden dargelegt wird. Zudem weist der periplasmatische Raum eine Tiefe von bis zu 19 – 24 nm auf,^{26,171} so dass der Kontakt der äußeren Membran zu den Partikel im Periplasma zumindest in Flüssigkeit von deren Position im Periplasma abhängt und in einigen Bereichen nicht so eng sein mag, wie die dichte Anordnung der Protrusionen in den AFM-Abbildungen nahelegt (Abb. 56, Abb. 57).

- b) Die äußere Membran ist eine dynamische Grenzfläche, durch die Stofftransport z.B. über Kanäle stattfindet, die sich aber auch selbst kontinuierlich in Bewegung befindet. Hier sind beispielsweise Wachstums- und Teilungsprozesse zu nennen. Darüber hinaus werden Stoffe an die Umgebung abgegeben, wobei in diesem Zusammenhang besonders die Ausbildung von Vesikeln von Interesse ist. Die sogenannten Outer Membrane Vesicles (MV) haben einen Durchmesser von 50 – 250 nm und bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, deren Aufbau weitgehend dem der OM ähnelt.³⁰ In ihrem Inneren sind Proteine des Periplasmas enthalten, jedoch keine cytoplasmatischen Moleküle. Sie ermöglichen einen Austausch mit benachbarten Zellen, wobei die transportierten Moleküle sowohl als Informationsträger für Bakterien derselben Art dienen können (z.B. Quorum Sensing)¹⁸¹ als auch artfremde und damit konkurrierende Bakterien¹⁸² sowie tierische¹⁸³ und pflanzliche Zellen¹⁸⁴ schädigen können. Diese Vesikel bilden sich als Ausstülpungen auf der äußeren Membran und werden durch Abschnürung freigesetzt. Der Mechanismus der Ausbildung dieser MV ist bislang nicht geklärt, es wurden aber 3 Modelle vorgeschlagen, die sich teilweise ergänzen. Grundlegend ist allen Modellen, dass Verbindungen zwischen OM und PG, die u. a. durch Lipoproteine wie Lpp ausgebildet werden, in den Bereichen, in denen sich Vesikel bilden seltener auftreten (Abb. 60).³⁰ Kommt es zu einem asymmetrischen Wachstum, bei dem die äußere Membran schneller an Fläche zunimmt, als das darunter liegende Peptidoglycan, kann sich die OM dort nach außen wölben.¹⁸⁵ Als weiterer möglicher Grund für diese Wölbung wird die lokale Ansammlung von Abbauprodukten des Peptidoglycan genannt, die bei Veränderungen der Zellform oder beim Wachstum frei werden.¹⁸⁶ Einer dritten Theorie zufolge führt die hohe Konzentration negativ geladener LPS-Moleküle (B-Band), die überproportional häufig in MV vorkommen, zu einer elektrostatischen Abstoßung und damit zu Ausbildung von Kugelformen.¹⁸³ Dieses wird durch lokale Erniedrigungen der Konzentration oder Komplexierung zweiwertiger Kationen wie z.B. Magnesium verstärkt, die normalerweise für eine Ladungskompensation verantwortlich sind.³⁰ Es ist also denkbar, dass es sich bei den beschriebenen Protrusionen um Vorstufen solcher Vesikel handelt. Aufgrund der großen Anzahl der Protrusionen auf der Bakterienmembran kann man annehmen, dass sich nicht in jedem Fall ein Vesikel bilden wird. Zudem sind in nur wenigen Abbildungen größere Protrusionen erkennbar, die bei der Entwicklung von MV auftreten müssten. Es ist bekannt, dass die Anzahl der gebildeten Vesikel zwischen den verschiedenen Bakterienarten schwankt³⁰ und wahrscheinlich auch von äußeren Einflüssen abhängig ist. Daher kann man annehmen, dass *S. meliloti* unter den hier gegebenen Bedingungen vergleichsweise wenig MV produziert. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die AFM-Spitze Vesikel mechanisch von der Membran abschert und daher nicht bildlich darstellen kann. Da jedoch auch kaum größere Vorstufen von Vesikeln erkennbar sind, die wegen der größeren Kontaktfläche fester an der Membran gebunden sein sollten, ist eine solche Veränderung der Probe nicht anzunehmen.

c) Eine dritte Ursache der Protrusionen auf den Bakterien kann neben membranumschlossenen partikulären Strukturen und der Ausbildung von Vesikeln auch in dem Aufbau der Membran selbst liegen. Der äußere Monolayer der OM (von *E. coli*) besteht zu $\frac{3}{4}$ aus LPS und $\frac{1}{4}$ aus Proteinen,¹¹ die heterogen verteilt sind, wodurch es zu Unterschieden der Dicke der Membran kommen kann. Wie bereits dargelegt wurde, ist der flexible Teil des O-Antigens des LPS in wässrigem Medium mittels AFM nicht darstellbar.²⁵ Die Länge des Lipid A und des sich daran anschließenden Core-Bereichs deckt sich mit der gemessenen Höhe der Protrusionen. Da der Stamm Rm6963 gerade in diesem Bereich verkürzte Strukturen aufweist, ist die reduzierte Höhe der Protrusionen bei Rm6963 ein Indiz dafür, dass die Protrusionen Ansammlungen von LPS-Molekülen darstellen. Amro beschreibt bei *E. coli* ähnliche Oberflächenstrukturen und äußert die Vermutung, dass die Zwischenräume der Protrusionen durch Membranproteine gebildet werden, die LPS-Patches voneinander trennen.²⁸ Ein vergleichbarer Aufbau der Membran ist ebenso bei *S. meliloti* wahrscheinlich.

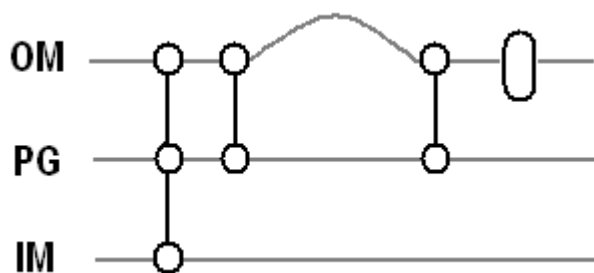


Abb. 60 Modell der Bakterienhülle mit Äußerer Membran (OM), Peptidoglycan (PG) und Innerer Membran (IM). Bereiche ohne verbindende Proteine (o-o) und ggf. mit LPS angereichert können zu Protrusionen anschwellen. Größere Proteine wie Omp (Zylinder) sind in der OM eingelagert.

Es ist ersichtlich, dass die hier beschriebenen Erklärungsmodelle für die Ausbildung der Protrusionen Gemeinsamkeiten aufweisen und sich teilweise ergänzen können. Die lokale Verankerung der OM am PG ist in allen Fällen eine wichtige Komponente der Modelle, da die entsprechenden Verbindungspunkte die laterale Ausdehnung der Protrusionen begrenzen (Abb. 60). Nimmt man an, dass die hier beschriebenen Protrusionen auf Ansammlungen von LPS zurückgehen, würde das die gezielte Anreicherung von negativ geladenem LPS des B-Band-Typs sowie das Einbringen von bestimmten Chinolonen (wie z.B. PQS in *Pseudomonas*), die Magnesium komplexieren in lokal begrenzten Bereichen erleichtern. Dadurch könnte die Ausbildung von MV nach dem dritten dargestellten Modellmechanismus induziert werden.³⁰

Protrusionen: Veränderungen durch Trocknung

Im Unterschied zu den rundlichen Protrusionen in Flüssigkeit treten bei Bakterien nach der Trocknung wellenförmige Strukturen auf. Deren Entstehung können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Die Unebenheiten in elektronenmikroskopischen Bildern werden als Artefakte interpretiert, die durch den Trocknungsvorgang hervorgerufen werden.¹⁸⁷ Eine eingehende Analyse wird daher kaum durchgeführt. Geht man von einer Faltung der Bakterienhülle aus, ist zu beachten, dass diese einen Durchmesser von ca. 20 nm aufweist (für *E. coli* 19 – 24 nm,^{26,171} *P. aeruginosa* 24 ± 4 nm¹⁷¹). Bei einer mittels XHR SEM gemessenen Breite der Falten von 18 ± 4 nm kann sich aus geometrischen Gründen nicht die gesamte Hülle auffalten, gleiches gilt auch unter Berücksichtigung der um

8 nm größeren Breite der Falten, die mit AFM bestimmt wurde (wobei hier auch die Spitzengeometrie zu berücksichtigen ist). Die Dimensionen der Falten machen es also notwendig, dass sich die Schichten der Bakterienhülle trennen. Dieser Vorgang ist bei getrockneten Bakterien¹⁸⁰ und auch in Flüssigkeit bei der Ausbildung eines plasmolysis space infolge erhöhter Osmolarität des Mediums beschrieben worden.²⁶ Man kann also davon ausgehen, dass die Protrusionen in Trockenheit eine Auffaltung der äußeren Membran darstellen. Eine Trennung der Verbindungen der äußeren Membran zum Peptidoglycan ist ebenfalls wahrscheinlich, da für eine gemeinsame Auffaltung auch dieser beiden Schichten die gemessenen Dimensionen kaum ausreichen (Dicke des PG und Abstand von der OM: *P. aeruginosa* 2,4 nm und 6,2 nm, *E. coli* 6,9 nm und 5,3 nm).¹⁷¹

Ausgehend von den in Flüssigkeit auftretenden Protrusionen liegt die Hypothese nahe, dass diese rundlichen Strukturen die Basis sind, auf der sich die Faltung der OM entwickelt. Unabhängig von der genauen Ursache für das Auftreten der Protrusionen in Flüssigkeit ist wahrscheinlich, dass sich vor allem in deren Randbereichen Verbindungen zu dem Peptidoglycan sowie der inneren Membran befinden. Der Wasserverlust infolge der verschiedenen osmotischen Bedingungen und stärker noch durch die Trocknung üben eine Spannung auf diese Verbindungen aus, da das PG sich teilweise elastisch zusammenziehen kann,¹⁸⁸ was der OM kaum möglich ist.²⁰ Durch die Trennung der von Lipoproteinen vermittelten Bindungen (Lpp bildet 8,3 nm lange zylinderförmige Trimere¹⁸⁹) kommt es an diesen Stellen zu einem Verschmelzen benachbarter rundlicher Protrusionen, so dass sich längliche Falten bilden. Die relative Anordnung der fusionierenden Protrusionen zueinander kann die unregelmäßige, wellenartige Form der Falten erklären. Der Durchmesser der Protrusionen sowohl in Flüssigkeit (33 ± 8 nm) als auch der Falten in Trockenheit (26 ± 6 nm) ist vergleichbar und stützt eine solche Interpretation.

Meist werden mikroskopische Untersuchungen an MV mittels TEM an Schnitten eingebetteter Bakterien durchgeführt. Vesikel sind dabei oft erst erkennbar, wenn sie eine gewisse Größe erreicht haben so dass sie sich im Profil von der Membran abheben. Aufgrund der zweidimensionalen Darstellung der Schnittebenen (Dicke ca. 50 nm) sind kleinere Unebenheiten der äußeren Membran, wie sie in dieser Arbeit untersucht werden nur schwer auszumachen beziehungsweise als natürliche strukturelle Einheiten von Artefakten zu unterscheiden. Hier bietet AFM eine sinnvolle Ergänzung zur Transmissions-Elektronenmikroskopie. Besonders da auch der zeitliche Verlauf der Ausbildung von Vesikeln unter nativen Bedingungen messbar sein sollte, stellt diese Methode ein geeignetes Mittel dar, die teilweise noch offenen Fragen zu klären. Ebenso könnten die Auswirkungen von Stoffen untersucht werden, die die Bildung von Vesikeln induzieren oder potentiell beeinflussen. Die Untersuchung von Bakterien wie *P. aeruginosa*, die in dieser Hinsicht gut erforscht sind und vergleichsweise viele Vesikel ausbilden kann eine gute Basis für eine weitere Evaluation der Darstellung von Vesikeln mittels AFM sein.

4.3.4 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde das gram-negative Bakterium *S. meliloti* hinsichtlich bestimmter Oberflächenstrukturen untersucht, die häufig auf SEM-Abbildungen gefunden werden. Um deren Ursprung aufzuklären und dabei mögliche Präparationsartefakte auszuschließen, sind mit SEM und AFM komplementäre Methoden eingesetzt worden. So wurde sukzessive auf die einzelnen Schritte der für SEM nötigen Präparation verzichtet und Veränderungen der Probe mit den jeweiligen Bedingungen korreliert.

Die Resultate zeigen, dass die Oberfläche chemisch fixierter und getrockneter Bakterien praktisch vollständig mit wulstartigen Ausstülpungen von etwa 25 nm Breite und 80 nm Länge bedeckt ist. Diese Strukturen sind an Luft (AFM) wie auch im Vakuum (SEM) präsent, daher können die Druckänderungen wie auch die Metallbeschichtung als Ursache ausgeschlossen werden. In wässriger Umgebung finden sich anstelle der Wülste runde Protrusionen von etwa 30 nm Durchmesser (AFM). Ein gesteigerter osmotischer Druck des Mediums bedingt einen Wasserverlust der Bakterien und damit einen Größenanstieg der Protrusionen. Wahrscheinlich führt ein analoger Prozess während des Trocknens eine Fusion benachbarter Protrusionen herbei. Die Wülste entwickeln sich demnach aus natürlichen Strukturen der Bakterienhülle.

Untersuchungen zweier Mutanten, die ein verkürztes LPS beziehungsweise kein EPS (exoY⁻) synthetisieren, geben Aufschluss über den biologischen Ursprung der Protrusionen. Bei einem verkürzten LPS sinkt auch die Höhe der Protrusionen, was eine direkte Beteiligung an deren Aufbau anzeigt. Dagegen bildet EPS eine Schicht auf der Bakterienoberfläche, bei deren Fehlen die gemessene Höhe der Protrusionen steigt. Geht man davon aus, dass die Verknüpfungen, die zwischen der Äußeren Membran und dem Peptidoglycan bestehen, sich vor allem in den Randbereichen der Protrusionen befinden und diese selbst lokale Konzentrationen von LPS darstellen, lassen sich die hier dargestellten Resultate gut erklären: Die Auffaltung der Äußeren Membran entsteht durch das Lösen von Bindungen zum Peptidoglycan und der daraus resultierenden Fusion der angrenzenden Protrusionen.

Für die Abbildung von Bakterien in Flüssigkeit spielt deren Immobilisierung eine entscheidende Rolle. Die für diese Arbeit entwickelte Technik hat sich aufgrund der erreichten Auflösung der Darstellungen als sehr erfolgreich erwiesen. Es wurden auf lebenden Bakterien Oberflächenstrukturen charakterisiert, deren Dimensionen im Bereich einzelner Membranproteine liegen. Damit wurde die Basis für weitere Untersuchungen von Bakterien unter physiologischen Bedingungen gelegt. So könnte die von Hansmeier *et al.* mit getrockneten Proben begonnene Analyse von S-Layern an lebenden Bakterien fortgesetzt werden. Weiterhin eröffnet sich die Möglichkeit, die Entstehung von Outer Membrane Vesicles an Bakterien zu verfolgen. Deren Bedeutung als Informationsträger zwischen Bakterien (Quorum Sensing) sowie gegenüber Wirtsorganismen (Symbiose oder Parasitismus) unterstreicht ihre Bedeutung als Forschungsobjekte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Nanobiotechnologie kombiniert biologische und nicht-biologische Forschung mit dem Ziel, Synergieeffekte dieser Zukunftstechnologien zu realisieren. Die vorliegende Studie widmet sich zweier Themenfelder dieses Komplexes: Zum Einen werden Oberflächen biologischer Zellen bis in den Nanometerbereich charakterisiert (Kap. 4.2.3 und 4.3). Solche Membranen stellen wichtige Grenzflächen für den selektiven Stoff- und Informationstransport zwischen biologischen Systemen und ihrer Umgebung dar. Dabei bewirkt die Bindung von Molekülen oder nanoskaligen Materialien deren Aufnahme beziehungsweise initiiert eine Signalkaskade, die zelluläre Reaktionen auslöst. Solche Bindungsreaktionen stellen das zweite Arbeitsfeld dar. Die Erforschung der Prinzipien, welche der Bindung von Nanopartikeln zugrunde liegenden (Kap. 4.2.4), eröffnet Möglichkeiten zur Beurteilung und Beeinflussung der toxikologischen Eigenschaften wie auch der gezielten Anwendung in der Nanomedizin und Pharmazie. Sowohl durch Nanopartikel als auch durch biologische Stimuli können zelluläre Stress- oder Abwehrreaktionen ausgelöst werden. Die Interaktion der daran beteiligten Moleküle wird über spezifische Bindungsreaktionen vermittelt, was ebenfalls untersucht wurde (Kap. 4.1).

Die fortschreitende nanotechnologische Forschung schafft wachsende Einsatzmöglichkeiten von Nanopartikeln, wodurch es häufiger zu einem Kontakt mit dem menschlichen Organismus kommt. In dieser Studie sind Methoden entwickelt worden, mit denen die Wechselwirkung zwischen NP und tierischen Zellen mikroskopisch verfolgt und hinsichtlich der wirkenden Kräfte analysiert wurden. In Flüssigkeit abgebildete Zellen des Lungengewebes zeigen nach Inkubation mit NP eine erhöhte Anzahl an Protrusionen, die gebundene NP darstellen. Die Resultate sprechen für eine gleichmäßige Verteilung der Partikel und damit auch der an der Bindung beteiligten Zellstrukturen. Die Größe der Protrusionen von bis zu mehreren hundert Nanometern stimmt mit den Ergebnissen überein, die von Projektpartnern in Partikeldispersionen gemessen wurden. Dabei haben die Umgebungsparameter wie der pH-Werte und die Salzkonzentration sowie eine Adsorption von Proteinen an der Partikeloberfläche entscheidenden Einfluss auf die Anordnung der Primärpartikel zu größeren Einheiten. So konnte belegt werden, dass die untersuchten anorganischen NP unter den üblichen Versuchsbedingungen weitgehend in agglomerierter Form vorliegen und auch so von den Zellen gebunden werden.

Durch die Kombination von AFM und Fluoreszenzmikroskopie wurden neue Analysemöglichkeiten erschlossen, da so eine eindeutige Differenzierung der Partikel von zellulären Strukturen erreicht wurde. Weiterhin konnte auf diese Weise eine Unterscheidung an der Oberfläche gebundener und bereits von der Zelle aufgenommener Partikel realisiert werden. Der Aufnahmeprozess ist anhand der Topographie der AFM-Abbildungen zu messen, da die fluoreszenten Polymerbeads einzeln vorliegen und damit eine einheitliche Größe aufweisen. Eine zeitliche Verfolgung der Trajektorie im Zellinneren sollte Aussagen über mögliche aktive Transportmechanismen zulassen und wurde in ersten Messungen mittels 2-Photonenmikroskopie evaluiert. In Verbindung mit einem AFM lässt sich somit der Weg der NP von der Bindung auf der Zelloberfläche bis hin zu intrazellulären Zielen beschreiben. Auch allein ein AFM bietet die Möglichkeit, strukturelle Informationen aus dem Zellinneren zu erhalten, wie hier an Abbildungen von Nucleoli im Zellkern gezeigt wurde. Mit entsprechenden technischen Erweiterungen des Aufbaus, wie sie von Tetard beschrieben werden, wird auch die Detektion von intrazellulären NP möglich.¹³³ Der Aufbau eines solchen Systems und eine Kalibration der dritten räumlichen Dimension beispielsweise mit fluoreszenten Partikeln sollten als nächste Schritte durchgeführt werden. So könnte der Wert einer AFM-basierten Technik für die Analyse des intrazellulären Transports von Partikeln in

Hinblick auf die Nanotoxikologie wie auch den Einsatz als Drug-Carrier nochmals gesteigert werden.

Die Abbildung von NP-Agglomeraten auf der Zelloberfläche wurde durch die Trocknung der Zellen deutlich verbessert, so dass der Aufbau aus einzelnen Primärpartikeln klar erkennbar wird. Gleichzeitig können so zelluläre Strukturen dargestellt werden, die in Flüssigkeit nicht abzubilden sind. Das bekommt besondere Bedeutung, da die NP häufig assoziiert mit Microvilli vorliegen, was ein Anzeichen für deren Beteiligung an der Bindung von NP ist. Gleiches ergibt sich auch aus SEM-Abbildungen, die wegen der signifikant kürzeren Messdauer bei dehydrierten Proben gegenüber der AFM-Technik einen Vorteil bieten.

Kraftspektroskopische Messungen wurden zu mechanistischen Studien der Partikelbindung an der Zelloberfläche durchgeführt. Dabei weisen NP mit deutlich differierenden Zusammensetzungen und Eigenschaften vergleichsweise geringe Unterschiede der Bindungskräfte auf (34 – 38 pN), was für ähnliche Bindungsmechanismen spricht. Entgegen der Erwartung kommen hier aufgrund des nivellierenden Effektes des umgebenden Mediums auf das zeta-Potential besonders elektrostatische Wechselwirkungen in Frage. Dieser Effekt ist auch bei der Interpretation von anderen ähnlichen Studien zu evaluieren und mit zu berücksichtigen. Mit steigender Kontaktzeit zwischen der funktionalisierten Spitze und der Zelle nimmt die gesamte Abrisskraft zu, wobei es zu gestaffelten Abrissen von einzelnen Tethern kommt. Die Bindung zu NP-Agglomeraten wird also sukzessive an mehreren Stellen aufgebaut und so verstärkt. Durch Force-Volume Messungen konnte für CeO₂-NP gezeigt werden, dass die Bindungsereignisse und –kräfte gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt sind. Neben der Plasmamembran kommen wie erwähnt besonders Microvilli als Bindungsstellen in Betracht, die auch Ausgangspunkt für Tether sein können.

Die Fragen nach den zellulären Bindungsstellen und damit verbunden die nach den jeweiligen Aufnahmemechanismen der NP sind von zentraler Bedeutung für weiterführende Projekte. Dabei sollte den Microvilli besondere Aufmerksamkeit beigemessen werden, da sie eine hohe Dichte an bestimmten Rezeptorproteinen aufweisen. Um den Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen bei der Bindung der NP genauer zu evaluieren, bieten sich Vesikel und gespreitete Lipidmembranen als Modellsysteme an. So können definierte Bedingungen geschaffen und die Ergebnisse eindeutiger interpretiert werden. Ebenso wird die Untersuchung einer Bindung an ausgewählte Membranproteine möglich. Damit sind solche Messungen auch zur Kontrolle von gezielt funktionalisierten NP als Drug-Carrier sinnvoll. Welche Wege der Partikelaufnahme und eines möglichen intrazellulären Transports von der Zelle genutzt werden, ist in Abhängigkeit von den Eigenschaften der NP zu untersuchen. Die Inhibition der verschiedenen Endocytosemechanismen oder eine Kolokalisation der NP mit beteiligten Proteinen sind dazu geeignete nächste Schritte. Die ersten Ergebnisse mit dem 2PLSM geben gute Ansatzpunkte für eine weitere Arbeit in dieser Richtung.

Basierend auf den Erfahrungen, die bei der Abbildung tierischer Zellen gewonnenen wurden, konnten hochaufgelöste Darstellungen von Bakterien realisiert werden. So wurde es möglich, Oberflächenstrukturen lebender Zellen bis hinab auf Dimensionen einzelner Membranproteine zu vermessen. Durch den Einsatz sowohl von SEM als auch von AFM ist es gelungen, ein breites Spektrum an Präparationstechniken systematisch zu untersuchen und die Veränderungen der Bakterienhülle mit den äußeren Bedingungen zu korrelieren. Die auf SEM-Abbildungen typischerweise zu beobachtenden Ausstülpungen entstehen demnach nicht *de novo*, sondern entwickeln sich aus natürlichen Membranstrukturen, die auf lebenden Bakterien häufig festgestellt wurden. Dafür sprechen die ähnlichen Dimensionen sowie der Aufbau der Bakterienhülle. Die natürlichen Protrusionen stellen wahrscheinlich Lipiddomänen angereichert mit LPS dar, was anhand von Vergleichen mit entsprechenden Mutanten belegt wurde. Es ist denkbar, dass es sich um Vorstufen von Vesikeln (OMV) handelt, die von Bakterien als Träger von Informationen oder auch Giftstoffen genutzt

werden. Die in dieser Studie entwickelte Immobilisierungstechnik ermöglicht die Untersuchung lebender Bakterien über längere Zeiträume ohne sie mechanisch zu fixieren. Deformationen der Zellen werden so vermieden. Die Technik ist daher gut geeignet, Wachstumsprozesse von Vesikeln oder ganzen Bakterien unter weitgehend nativen Bedingungen zu verfolgen. So können in weiteren Studien beispielsweise Effekte von Wirkstoffen auf Bakterien auf zellulärer Ebene beobachtet werden.

Bakterielle LPS-Moleküle können im tierischen Organismus eine starke und mitunter tödliche Immunantwort induzieren. Auch Pflanzen zeigen einige Abwehrreaktionen, die aus dem Tierreich bekannt sind. So wird die Bildung von ROS wahrscheinlich durch ähnliche Signaltransduktionswege gesteuert. Daher wurde das kleine GTP-bindende Protein Ms-Rac1, ein pflanzlicher Regulator, umfassend charakterisiert und hinsichtlich seiner Struktur und Reaktionen mit dem humanen Hs-Rac1 verglichen. Sequenzanalysen lassen eine Homologie dieser Proteine vermuten, die nun durch experimentelle Daten zu verifizieren ist. Das so gewonnene Verständnis der Steuerungsmechanismen ist notwendig für eine Optimierung der Abwehr und Resistenz gegenüber phytopathogenen Bakterien.

Die Untersuchung mittels FCS ermöglicht im Gegensatz zu anderen Techniken parallel zu Bindungsstudien auch die Charakterisierung hydrodynamischer Parameter. Daher konnte gezeigt werden, dass Ms-Rac1 die Fähigkeit besitzt, Homo-Oligomere zu bilden, wobei die Funktion der GTP-Bindung erhalten bleibt. Das ist neben dem humanen Hs-Rac1 nur für wenige Vertreter dieser Proteinfamilie bekannt und eröffnet zusätzliche Möglichkeiten der Regulation. Eine generelle strukturelle Gemeinsamkeit des pflanzlichen Ms-Rac1 mit den tierischen Proteinen wird an dem typischen Einfluss von Magnesium auf die Bindungskinetik deutlich: Die Reduktion der Magnesiumkonzentration im Medium bewirkt die Entfernung des Cofaktors Magnesium aus der Bindungstasche und beschleunigt damit die Dissoziation des GTP um mehr als das 10fache. Bei normaler Magnesiumkonzentration beträgt die off-Rate $k_{\text{diss}} 0,018 \text{ min}^{-1}$, was sich nur um den Faktor 1,7 von dem Wert des humanen Hs-Rac1 unterscheidet. Für die Dissoziationskonstante K_D wurde eine obere Grenze von $18,3 \mu\text{M}$ bestimmt. Alle erarbeiteten Ergebnisse unterstreichen die deutliche Homologie von Ms-Rac1 und den humanen Hs-Rac Proteinen auf struktureller sowie funktionaler Ebene. Damit stützen sie die Annahmen, die dem Modelling der Tertiärstruktur zugrunde gelegt wurden.

Die erfolgreichen Messungen verdeutlichen die Vielseitigkeit von FCS: Sowohl hydrodynamische wie auch photophysikalische Daten geben Aufschluss über die Bindungsereignisse zwischen Nukleotiden und Proteinen. Auf dieser Basis können nun weitere Interaktionen der Signaltransduktion durch Ms-Rac1 und in gleicher Weise der gesamten Familie der G-Proteine evaluiert werden. Die Reaktion mit Rho-GDI sollte analog zu Hs-Rac1 nur mit Monomeren stattfinden und das Gleichgewicht der Oligomerisation auf diese Seite ziehen. Die Regulation der off-Rate durch die Bindung von Rho-GDI (verlangsamend) sowie GEF (beschleunigend) ist mit dem etablierten System ebenfalls messbar. Selbst die Untersuchung innerhalb lebender Zellen ist möglich, wobei dort die Kreuzkorrelationsanalyse mit zwei gelabelten Bindungspartnern besondere Vorteile bringen wird.

In Anbetracht des breiten Spektrums an regulatorischen Funktionen von G-Proteinen nicht zuletzt auch hinsichtlich der Tumorentwicklung bei Menschen besteht hier ein wichtiges Forschungsfeld. Genauso zeigt der Einsatz von Nanopartikeln in der Krebstherapie vielversprechende Ansätze und unterstreicht die Notwendigkeit wie auch das große Potential nanowissenschaftlicher Arbeit im Bereich der Biologie.

Glossar

ACF	Autocorrelation Function
AFM	Atomic Force Microscope
AOTF	Acousto-Optical Tunable Filter
APD	Avalanche Photodiode
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
cDNA	complementary DNA
CEF	Collection Efficiency Function
CNT	Carbon Nanotube
CPD	Critical Point Drying
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DLS	Dynamic Light Scattering
DLVO-Theorie	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theory
EDX	Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy
EM	Electron Microscope
EPS	Exopolysaccharide
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FIDA	Fluorescence Intensity Distribution Analysis
FILDA	Fluorescence Intensity and Lifetime Distribution Analysis
FN	Fibronectin
GAP	GTPase Activating Protein
GDI	Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
G-Protein	GTP-binding Protein (hier besonders die Untergruppe: Small G-Protein)
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
GTP	Guanosine Triphosphate
HBSMD	Hepes Buffered Saline +Magnesium +DTT (biologischer Puffer)
HMDS	Hexamethyldisilazane
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICS	Intersystem Crossing
Kdo	2-Keto-3-Desoxy-Octonate (typischer Bestandteil von LPS)

kDa	Kilodalton (Einheit des Molekulargewichts MW; entspricht u)
KPM	Kelvin Probe Microscope
KRP	Krebs-Ringer Puffer
LM	Lichtmikroskopie
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	Massenspektrometrisches Verfahren
MFM	Magnetic Force Microscope
MWCNT	Multi-Walled Carbon Nanotube
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
NP	Nanopartikel
OM	Outer Membrane (äußere Lipidmembran von gram-negativen Bakterien)
Omp	Outer Membrane Protein
OMV	Outer Membrane Vesicle
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline (biologischer Puffer)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEI	Polyethylenimin
PCH	Photon Counting Histogram
PG	Peptidoglycan
PM	Plasmamembran
RBO	Respiratory Burst Oxidase
ROP	Rho of Plants (pflanzliche G-Proteine verwandt mit Rho-Typ)
ROS	Reactive Oxygen Species
S-Layer	Surface-Layer (zweidimensionale Proteinkristalle auf der Bakterienhülle)
SDS-PAGE	Gelelektrophorese zur Massenbestimmung von Proteinen
SEM	Scanning Electron Microscope
SICM	Scanning Ion Conductance Microscope
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscope
SPM	Scanning Probe Microscope
SThM	Scanning Thermal Microscope
STED	Stimulated Emission Depletion
STM	Scanning Tunneling Microscope
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting
TEM	Transmission Electron Microscope
TLFI	Time Lapse Fluorescence Imaging
TREC	Topography and Recognition (AFM: Abbildung und Kraftspektroskopie)

Literaturverzeichnis

1. Fraysse,N., Couderc,F. & Poinsoot,V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1365-1380 (2003).
2. Torres,M.A., Jones,J.D.G. & Dangl,J.L. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol.* **141**, 373-378 (2006).
3. Schiene,K., Puhler,A. & Niehaus,K. Transgenic tobacco plants that express an antisense construct derived from a Medicago sativa cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 761-770 (2000).
4. Jones,K.M., Kobayashi,H., Davies,B.W., Taga,M.E. & Walker,G.C. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 619-633 (2007).
5. Wennerberg,K., Rossman,K.L. & Der,C.J. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843-846 (2005).
6. Takai,Y., Sasaki,T. & Matozaki,T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**, 153-208 (2001).
7. Berken,A. & Wittinghofer,A. Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 380-393 (2008).
8. Berken,A. ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2446-2459 (2006).
9. Paduch,M., Jelen,F. & Otlewski,J. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 829-850 (2001).
10. Garcia-Brugger,A. *et al.* Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 711-724 (2006).
11. Rietschel,E.T. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**, 217-225 (1994).
12. Boller,T. & Felix,G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379-406 (2009).
13. Babior,B.M. NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1476 (1999).
14. Torres,M.A. & Dangl,J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 397-403 (2005).

15. Kawasaki,T. *et al.* The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10922-10926 (1999).
16. Diebold,B.A. & Bokoch,G.M. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol.* **2**, 211-215 (2001).
17. Brecht,M. *et al.* The use of surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) to monitor the interaction of the plant G-proteins Ms-Rac1 and Ms-Rac4 with GTP. *J. Biotechnol.* **112**, 151-164 (2004).
18. Voet,D. & Voet,J.G. *Biochemistry.* John Wiley & Sons, (1995).
19. Vollmer,W. & Holtje,J.V. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J. Bacteriol.* **186**, 5978-5987 (2004).
20. Vadillo-Rodriguez,V., Schooling,S.R. & Dutcher,J.R. In situ characterization of differences in the viscoelastic response of individual gram-negative and gram-positive bacterial cells. *J. Bacteriol.* **191**, 5518-5525 (2009).
21. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science, New York (2002).
22. Beveridge,T.J. & Davies,J.A. Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the Gram stain. *J. Bacteriol.* **156**, 846-858 (1983).
23. Arnoldi,M. *et al.* Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids Relat Interdiscip. Topics.* **62**, 1034-1044 (2000).
24. Yao,X. *et al.* Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **23**, 213-230 (2002).
25. Beveridge,T.J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725-4733 (1999).
26. Schwarz,H. & Koch,A.L. Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-negative cell wall. *Microbiology* **141**, 3161-3170 (1995).
27. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2009).
28. Amro,N.A. *et al.* High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the *Escherichia coli* Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir* **16**, 2789-2796 (2000).
29. Deatherage,B.L. *et al.* Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* **72**, 1395-1407 (2009).
30. Mashburn-Warren,L.M. & Whiteley,M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **61**, 839-846 (2006).

31. Schabert,F.A., Henn,C. & Engel,A. Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. *Science* **268**, 92-94 (1995).
32. Sleytr,U.B. *et al.* S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **267**, 131-144 (2007).
33. Engelhardt,H. Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J. Struct. Biol.* **160**, 115-124 (2007).
34. Hansmeier,N. *et al.* The surface (S)-layer gene *cspB* of *Corynebacterium glutamicum* is transcriptionally activated by a LuxR-type regulator and located on a 6 kb genomic island absent from the type strain ATCC 13032. *Microbiology* **152**, 923-935 (2006).
35. Dupres,V., Alsteens,D., Pauwels,K. & Dufrene,Y.F. In vivo imaging of S-layer nanoarrays on *Corynebacterium glutamicum*. *Langmuir* **25**, 9653-9655 (2009).
36. Niehaus,K., Kapp,D. & Puhler,A. Plant Defense and Delayed Infection of Alfalfa Pseudonodules Induced by An Exopolysaccharide (Eps-I)-Deficient Rhizobium-Meliloti. *Planta* **190**, 415-425 (1993).
37. Heasman,S.J. & Ridley,A.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 690-701 (2008).
38. Ridley,A.J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**, 522-529 (2006).
39. Soldati,T. & Schliwa,M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 897-908 (2006).
40. Cooper,G.M. *The Cell - A Molecular Approach*. Sinauer Associates Inc., (2000).
41. Lorenz,M.R. *et al.* Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials* **27**, 2820-2828 (2006).
42. Alberts,B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, (2002).
43. Doherty,G.J. & McMahon,H.T. Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 857-902 (2009).
44. Simons,K. & Toomre,D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31-39 (2000).
45. Rejman,J., Oberle,V., Zuhorn,I.S. & Hoekstra,D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159-169 (2004).
46. Apodaca,G. Endocytic Traffic in Polarized Epithelial Cells: Role of the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Traffic* **2**, 149-159 (2001).
47. Burda,C., Chen,X., Narayanan,R. & El Sayed,M.A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.* **105**, 1025-1102 (2005).

48. Luther,W. & Bachmann,G. Nano.DE-Report 2009. Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), (2009).
49. Rolland,J.P. *et al.* Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10096-10100 (2005).
50. Kuhlbusch,T., Krug,H., Nau,K., (eds.), NanoCare: Health related Aspects of Nanomaterials. Dechema e.V., Frankfurt a. M. (2009).
51. Nel,A.E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **8**, 543-557 (2009).
52. Jiang,J., Oberdorster,G. & Biswas,P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 77-89 (2009).
53. Schulze,C. *et al.* Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* **2**, 51-61 (2008).
54. Gao,H., Shi,W. & Freund,L.B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 9469-9474 (2005).
55. Thakur,S.A., Hamilton,R., Jr., Pikkarainen,T. & Holian,A. Differential binding of inorganic particles to MARCO. *Toxicol. Sci.* **107**, 238-246 (2009).
56. Orr,G. *et al.* Syndecan-1 mediates the coupling of positively charged submicrometer amorphous silica particles with actin filaments across the alveolar epithelial cell membrane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**, 210-220 (2009).
57. McNamee,C., Pyo,N. & Higashitani,K. Atomic Force Microscopy study of the specific adhesion between a colloid particle and a living melanoma cell: effect of the charge and the hydrophobicity of the particle surface. *Biophys. J.* (2006).
58. Magde,D., Elson,E.L. & Webb,W.W. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705-708 (1972).
59. Application Manual: LSM 510 ConfoCor 2. Carl Zeiss, Advanced Imaging Microscopy, Jena (2001).
60. Single Molecule Spectroscopy - Nobel Conference Lectures. Springer-Verlag, (2001).
61. Boehmer,M. & Enderlein,J. Fluorescence Spectroscopy of Single Molecules under Ambient Conditions: Methodology and Technology. *ChemPhysChem* **4**, 792-808 (2003).
62. Chen,Y., Muller,J.D., Berland,K.M. & Gratton,E. Fluorescence fluctuation spectroscopy. *Methods* **19**, 234-252 (1999).
63. Palo,K. *et al.* Fluorescence intensity and lifetime distribution analysis: toward higher accuracy in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* **83**, 605-618 (2002).

64. Dittrich,P. & Schwille,P. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. *Appl. Phys. B* **73**, 829-837 (2001).
65. Marme,N., Knemeyer,J.P., Sauer,M. & Wolfrum,J. Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. *Bioconjug. Chem.* **14**, 1133-1139 (2003).
66. Dietrich,A., Buschmann,V., Muller,C. & Sauer,M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and competing processes in donor-acceptor substituted DNA strands: a comparative study of ensemble and single-molecule data. *J. Biotechnol.* **82**, 211-231 (2002).
67. Haustein,E. & Schwille,P. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods* **29**, 153-166 (2003).
68. Schwille,P. & Haustein,E. Biophysics Textbook Online (BTOL), (2000).
69. Van Craenenbroeck,E. & Engelborghs,Y. Quantitative characterization of the binding of fluorescently labeled colchicine to tubulin in vitro using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* **38**, 5082-5088 (1999).
70. Koppel,D.E. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A* **10**, 1938-1945 (1974).
71. Zeiss. Application Manual: LSM 510 ConfoCor 2. Carl Zeiss, Advanced Imaging Microscopy, Jena (2001).
72. Hell,S.W. & Wichmann,J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780-782 (1994).
73. Knoll,M. & Ruska,E. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **78**, 318-339 (1932).
74. Binnig,G., Quate,C.F. & Gerber,C. Atomic Force Microscope. *PRL* **56**, 930 (1986).
75. Handbook of Nanotechnology. Springer, (2004).
76. Butt,H.J. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophysical Journal* **60**(6), 1438-1444. 1-12-1991.
77. Tsilimbaris,M.K. *et al.* The use of atomic force microscopy for the observation of corneal epithelium surface. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 680-686 (2000).
78. Neumeister,J.M. & Ducker,W.A. Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers. *Review of Scientific. Instruments.* **65**, 2527-2531 (1994).
79. Cleveland,J.P., Manne,S., Bocek,D. & Hansma,P.K. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Review of Scientific. Instruments.* **64**, 403-405 (1993).

80. Gibson,C.T., Watson,G.S. & Myhra,S. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology* **7**, 259 (1996).
81. Hutter,J.L. & Bechhoefer,J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific. Instruments.* **64**, 1868-1873 (1993).
82. Tamayo,J. Energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy with low quality factors. *Applied Physics Letters* **75**, 3569-3571 (1999).
83. Anczykowski,B., Gotsmann,B., Fuchs,H., Cleveland,J.P. & Elings,V.B. How to measure energy dissipation in dynamic mode atomic force microscopy. *Applied Surface. Science* **140**, 376-382 (1999).
84. Muller,C.B. *et al.* Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *EPL (Europhysics Letters)* **83**, 46001 (2008).
85. Giard,D.J. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417-1423 (1973).
86. Lieber,M., Smith,B., Szakal,A., Nelson-Rees,W. & Todaro,G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **17**, 62-70 (1976).
87. Driscoll,K.E. *et al.* Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **31**, 516-527 (1995).
88. Jainchill,J.L., Aaronson,S.A. & Todaro,G.J. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* **4**, 549-553 (1969).
89. Casse,F., Boucher,C., Julliot,J.S., Michel,M. & Denarie,J. Identification and Characterization of Large Plasmids in Rhizobium-Meliloti Using Agarose-Gel Electrophoresis. *Journal of General Microbiology* **113**, 229-242 (1979).
90. Lagares,A. *et al.* A Rhizobium meliloti lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* **174**, 5941-5952 (1992).
91. Vincent,J.M. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. Blackwell Scientific Publ., Oxford-Edinburgh 1970 (1970).
92. Sehr,P. *et al.* Glucosylation and ADP Ribosylation of Rho Proteins: Effects on Nucleotide Binding, GTPase Activity, and Effector Coupling. *Biochemistry* **37**, 5296-5304 (1998).
93. Neal,S.E., Eccleston,J.F. & Webb,M.R. Hydrolysis of GTP by p21NRAS, the NRAS Protooncogene Product, is Accompanied by a Conformational Change in the Wild-Type Protein: Use of a Single Fluorescent Probe at the Catalytic Site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 3562-3565 (1990).
94. Wesner,D. Untersuchung molekularer Interaktionen in der pflanzlichen Signaltransduktion mittels FCS. Diplomarbeit (2004).

95. Shutes,A., Phillips,R.A., Corrie,J.E. & Webb,M.R. Role of magnesium in nucleotide exchange on the small G protein rac investigated using novel fluorescent Guanine nucleotide analogues. *Biochemistry* **41**, 3828-3835 (2002).
96. Seidel,C.A.M., Schulz,A. & Sauer,M.H.M. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. *J. Phys. Chem.* **100**, 5541-5553 (1996).
97. Bunney,T.D. *et al.* Structural insights into formation of an active signaling complex between Rac and phospholipase C gamma 2. *Mol. Cell* **34**, 223-233 (2009).
98. Garcia De La Torre,J., Huertas,M.L. & Carrasco,B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* **78**, 719-730 (2000).
99. Stigter,D., Alonso,D.O. & Dill,K.A. Protein stability: electrostatics and compact denatured states. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 4176-4180 (1991).
100. Pegram,L.M. & Record,M.T., Jr. Thermodynamic origin of Hofmeister ion effects. *J. Phys. Chem. B* **112**, 9428-9436 (2008).
101. Zhang,B. & Zheng,Y. Negative regulation of Rho family GTPases Cdc42 and Rac2 by homodimer formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 25728-25733 (1998).
102. Zhang,B., Gao,Y., Moon,S.Y., Zhang,Y. & Zheng,Y. Oligomerization of Rac1 gtpase mediated by the carboxyl-terminal polybasic domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 8958-8967 (2001).
103. Zhang,B., Zhang,Y., Wang,Z. & Zheng,Y. The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 25299-25307 (2000).
104. Patton,C., Thompson,S. & Epel,D. Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* **35**, 427-431 (2004).
105. Burstein,E.S. & Macara,I.G. Interactions of the ras-like protein p25rab3A with Mg²⁺ and guanine nucleotides. *Biochem. J.* **282** (Pt 2), 387-392 (1992).
106. Vetter,I.R. & Wittinghofer,A. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science* **294**, 1299-1304 (2001).
107. Berken,A., Thomas,C. & Wittinghofer,A. A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* **436**, 1176-1180 (2005).
108. Thomas,C., Fricke,I., Scrima,A., Berken,A. & Wittinghofer,A. Structural Evidence for a Common Intermediate in Small G Protein-GEF Reactions. *Molecular Cell* **25**, 141-149 (2007).
109. John,J. *et al.* Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J. Biol. Chem.* **268**, 923-929 (1993).

110. Wohland,T., Friedrich,K., Hovius,R. & Vogel,H. Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different fluorophores: evidence that the homopentameric 5-hydroxytryptamine type 3As receptor binds only one ligand. *Biochemistry* **38**, 8671-8681 (1999).
111. John,J. *et al.* Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* **29**, 6058-6065 (1990).
112. Atkins,P.W. *Physikalische Chemie.* (1999).
113. Bihari,P. *et al.* Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle. and Fibre. Toxicology* **5**, 14 (2008).
114. Cedervall,T. *et al.* Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 2050-2055 (2007).
115. Lamprecht,C. *et al.* AFM imaging of functionalized double-walled carbon nanotubes. *Ultramicroscopy* **109**, 899-906 (2009).
116. Nel,A., Xia,T., Madler,L. & Li,N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622-627 (2006).
117. Gumbiner,B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357 (1996).
118. Ludwig,T., Kirmse,R., Poole,K. & Schwarz,U.S. Probing cellular microenvironments and tissue remodeling by atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* **456**, 29-49 (2008).
119. Schott,D.H., Collins,R.N. & Bretscher,A. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J. Cell Biol.* **156**, 35-40 (2002).
120. Yalovsky,S., Bloch,D., Sorek,N. & Kost,B. Regulation of Membrane Trafficking, Cytoskeleton Dynamics, and Cell Polarity by ROP/RAC GTPases. *Plant Physiol.* **147**, 1527-1543 (2008).
121. Poole,K., Meder,D., Simons,K. & Muller,D. The effect of raft lipid depletion on microvilli formation in MDCK cells, visualized by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **565**, 53-58 (2004).
122. Shibata-Seki,T., Masai,J., Tagawa,T., Sorin,T. & Kondo,S. In-situ atomic force microscopy study of lipid vesicles adsorbed on a substrate. *Thin Solid Films* **273**, 297-303 (1996).
123. Benoit,M., Holstein,T. & Gaub,H.E. Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles. *European Biophysics Journal* **26**, 283-290 (1997).
124. Stan,R.-V. Structure and function of endothelial caveolae. *Microscopy Research and Technique* **57**, 350-364 (2002).

125. Campbell,L. *et al.* Caveolin-1 Expression and Caveolae Biogenesis during Cell Transdifferentiation in Lung Alveolar Epithelial Primary Cultures. *Biochemical. and Biophysical. Research Communications.* **262**, 744-751 (1999).
126. Derenzini,M. *et al.* Nucleolar function and size in cancer cells. *Am. J. Pathol.* **152**, 1291-1297 (1998).
127. Garcia,R., Magerle,R. & Perez,R. Nanoscale compositional mapping with gentle forces. *Nat. Mater.* **6**, 405-411 (2007).
128. Melcher,J. *et al.* Origins of phase contrast in the atomic force microscope in liquids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 13655-13660 (2009).
129. Scott,W.W. & Bhushan,B. Use of phase imaging in atomic force microscopy for measurement of viscoelastic contrast in polymer nanocomposites and molecularly thick lubricant films. *Ultramicroscopy* **97**, 151-169 (2002).
130. Guigas,G., Kalla,C. & Weiss,M. Probing the nanoscale viscoelasticity of intracellular fluids in living cells. *Biophys. J.* **93**, 316-323 (2007).
131. Tamayo,J. & Garcia,R. Relationship between phase shift and energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters* **73**, 2926-2928 (1998).
132. Qian,D., Dickey,E.C., Andrews,R. & Rantell,T. Load transfer and deformation mechanisms in carbon nanotube-polystyrene composites. *Applied. Physics. Letters.* **76**, 2868-2870 (2000).
133. Tetard,L. *et al.* Imaging nanoparticles in cells by nanomechanical holography. *Nat. Nano.* **3**, 501-505 (2008).
134. Eckel,R. *et al.* Fluorescence-Emission Control of Single CdSe Nanocrystals Using Gold-Modified AFM Tips. *Small* **3**, 44-49 (2007).
135. Anderson,T.F. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **13**, 130-134 (1951).
136. Bray,J.B. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microscopy Research and Technique* **26**, 489-495 (1993).
137. Braet,F., De Zanger,R. & Wisse,E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *J. Microsc.* **186 (Pt 1)**, 84-87 (1997).
138. Lamprecht,C. *et al.* AFM imaging of functionalized carbon nanotubes on biological membranes. *Nanotechnology* **20**, 434001 (2009).
139. Bozzola,J.J. & Russel,L.D. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett Publishers, (1998).

140. Jaffe,E.A., Nachman,R.L., Becker,C.G. & Minick,C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest* **52**, 2745-2756 (1973).
141. Certificate of Analysis for FCS Gold. 2010. PAA.
142. Muhlfeld,C., Gehr,P. & Rothen-Rutishauser,B. Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract. *Swiss. Med. Wkly.* **138**, 387-391 (2008).
143. Murthy,S.K. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 129-141 (2007).
144. Faucheux,L.P. & Libchaber,A.J. Confined Brownian motion. *Phys. Rev. E* **49**, 5158 (1994).
145. Dokou,E., Barteau,M.A., Wagner,N.J. & Lenhoff,A.M. Effect of Gravity on Colloidal Deposition Studied by Atomic Force Microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **240**, 9-16 (2001).
146. Teeguarden,J.G., Hinderliter,P.M., Orr,G., Thrall,B.D. & Pounds,J.G. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol. Sci.* **95**, 300-312 (2007).
147. Limbach,L.K. *et al.* Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. *Environmental Science & Technology* **39**, 9370-9376 (2005).
148. Kemp,S.J. *et al.* immortalization of human alveolar epithelial cells to investigate nanoparticle uptake. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 591-597 (2008).
149. Gorelik,J. *et al.* Dynamic assembly of surface structures in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5819-5822 (2003).
150. Orr,G. *et al.* Submicrometer and nanoscale inorganic particles exploit the actin machinery to be propelled along microvilli-like structures into alveolar cells. *ACS Nano.* **1**, 463-475 (2007).
151. Arredouani,M.S. *et al.* MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *J. Immunol.* **175**, 6058-6064 (2005).
152. Ong,Q.K. & Sokolov,I. Attachment of nanoparticles to the AFM tips for direct measurements of interaction between a single nanoparticle and surfaces. *J Colloid Interface Sci.* **310**, 385-390 (2007).
153. Munoz-Javier,A. *et al.* Combined atomic force microscopy and optical microscopy measurements as a method to investigate particle uptake by cells. *Small* **2**, 394-400 (2006).
154. Leonenko,Z., Finot,E. & Amrein,M. Adhesive interaction measured between AFM probe and lung epithelial type II cells. *Ultramicroscopy* (2007).

155. Stearns,R.C., Paulauskis,J.D. & Godleski,J.J. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 108-115 (2001).
156. Hosu,B.G., Sun,M., Marga,F., Grandbois,M. & Forgacs,G. Eukaryotic membrane tethers revisited using magnetic tweezers. *Physical Biology* **4**, 67-78 (2007).
157. Raucher,D. & Sheetz,M.P. Characteristics of a Membrane Reservoir Buffering Membrane Tension. *Biophys. J.* **77**, 1992-2002 (1999).
158. Sun,M. *et al.* Multiple membrane tethers probed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **89**, 4320-4329 (2005).
159. Schmidtke,D.W. & Diamond,S.L. Direct observation of membrane tethers formed during neutrophil attachment to platelets or P-selectin under physiological flow. *J. Cell Biol.* **149**, 719-730 (2000).
160. Chen,S. & Springer,T.A. An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear. *J. Cell Biol.* **144**, 185-200 (1999).
161. Shao,J.Y., Ting-Beall,H.P. & Hochmuth,R.M. Static and dynamic lengths of neutrophil microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 6797-6802 (1998).
162. Majstoravich,S. *et al.* Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood* **104**, 1396-1403 (2004).
163. Hecht,E. *et al.* Atomic force microscopy of microvillous cell surface dynamics at fixed and living alveolar type II cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**, 2369-2378 (2011).
164. Helenius,J., Heisenberg,C.P., Gaub,H.E. & Muller,D.J. Single-cell force spectroscopy. *J. Cell Sci.* **121**, 1785-1791 (2008).
165. Pike,L.J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597-1598 (2006).
166. Lajoie,P. & Nabi,I.R. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell Mol. Med.* **11**, 644-653 (2007).
167. Munro,S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388 (2003).
168. Lingwood,D. & Simons,K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50 (2010).
169. Jacobson,K., Mouritsen,O.G. & Anderson,R.G. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell Biol.* **9**, 7-14 (2007).
170. Amako,K. & Umeda,A. Bacterial surfaces as revealed by the high resolution scanning electron microscope. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 297-299 (1977).
171. Matias,V.R., Al Amoudi,A., Dubochet,J. & Beveridge,T.J. Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* **185**, 6112-6118 (2003).

172. Bulla,L.A., Jr., St.Julian,G., Hesseltine,C.W. & Baker,F.L. *Methods in Microbiology*. (1973).
173. Schaer-Zammaretti,P. & Ubbink,J. Imaging of lactic acid bacteria with AFM--elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy* **97**, 199-208 (2003).
174. Milovic,N.M., Wang,J., Lewis,K. & Klibanov,A.M. Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 715-722 (2005).
175. Greif,D., Pobigaylo,N., Becker,A., Regtmeier,J. & Anselmetti,D. Protein dynamics in single bacterial cells on chip with spatio-temporal resolution. *Proceedings of the μ TAS 2009* accepted (2009).
176. Velegol,S.B., Pardi,S., Li,X., Velegol,D. & Logan,B.E. AFM Imaging Artifacts due to Bacterial Cell Height and AFM Tip Geometry. *Langmuir* **19**, 851-857 (2003).
177. Schulz,G.E. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1565**, 308-317 (2002).
178. Gonzalez,J.E., York,G.M. & Walker,G.C. Rhizobium meliloti exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* **179**, 141-146 (1996).
179. Niehaus,K., Lagares,A. & Puhler,A. A Sinorhizobium meliloti lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant Medicago sativa (Alfalfa) but fails to establish a symbiosis with Medicago truncatula. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 906-914 (1998).
180. Bayer,M.E. & Remsen,C.C. Structure of Escherichia coli after freeze-etching. *J. Bacteriol.* **101**, 304-313 (1970).
181. Mashburn-Warren,L. *et al.* Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol. Microbiol.* **69**, 491-502 (2008).
182. Li,Z., Clarke,A.J. & Beveridge,T.J. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* **180**, 5478-5483 (1998).
183. Kadurugamuwa,J.L. & Beveridge,T.J. Virulence factors are released from Pseudomonas aeruginosa in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**, 3998-4008 (1995).
184. Sidhu,V.K., Vorholter,F.J., Niehaus,K. & Watt,S.A. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv. campestris. *Bmc Microbiology* **8**, (2008).
185. Wensink,J. & Witholt,B. Outer-membrane vesicles released by normally growing Escherichia coli contain very little lipoprotein. *Eur. J. Biochem.* **116**, 331-335 (1981).

186. Zhou,L., Srisatjaluk,R., Justus,D.E. & Doyle,R.J. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 223-228 (1998).
187. Hillier,J. & Baker,R.F. The mounting of bacteria for electron microscope examination. *J. Bacteriol.* **52**, 411-416 (1946).
188. Yao,X., Jericho,M., Pink,D. & Beveridge,T. Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* **181**, 6865-6875 (1999).
189. Shu,W., Liu,J., Ji,H. & Lu,M. Core structure of the outer membrane lipoprotein from *Escherichia coli* at 1.9 σ resolution. *Journal of Molecular Biology* **299**, 1101-1112 (2000).

Veröffentlichungen

- Wesner,D., Brecht,M., Anselmetti,D., Niehaus,K., Ros,R., “Interaction of the small G-protein Ms-Rac1 from *Medicago sativa* with GTP“, in Vorbereitung
- Greif,D., Wesner,D., Regtmeier,J., Anselmetti,D., “Artefact or not? High resolution imaging of Dried and Living Single Bacterial Cell Surfaces“, *Microscopy Today*, **19**, 22-25 (2011)
- Greif,D., Wesner,D., Regtmeier,J., Anselmetti,D., “High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells“, *Ultramicroscopy*, **110**, 1290-1296 (2010)
- Wesner,D., Zünkeler,S., Tönsing,K., Anselmetti,D., in: „NanoCare: Health related Aspects of Nanomaterials“, T. Kuhlbusch, H. Krug, K. Nau (eds.), pp. 26 – 29, Dechema e.V. Frankfurt a. M. (2009)

Konferenzbeiträge

- Wesner,D., Zünkeler,S., Anselmetti,D., Tönsing,K., “The bio-nano-interface: Evaluating the binding of nanoparticles to cellular surfaces“, *Linz Winter Workshop*, Linz, Österreich, 2010 (Vortrag)
- Wesner,D., Anselmetti,D., Ros,R., „Looking inside a cell by scanning ist surface“ *SPM Workshop*, Hamburg, 26.-28.09. 2007 (Poster)
- Wesner,D., Brecht,M., Anselmetti,D., Niehaus,K., Ros,R., „Interaction of the small G-protein Ms-Rac1 from *Medicago sativa* with GTP“, *DPG Frühjahrstagung*, Dresden, 26.-31.03. 2006 (Poster)

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren. Aufgrund der interdisziplinären Natur der Projekte ist dies eine Reihe an Personen verschiedener Arbeitsgruppen und Partner.

- Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. Dario Anselmetti, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in seiner Gruppe durchzuführen. In seinem Labor habe ich exzellente Bedingungen für die experimentellen Arbeiten gefunden.
- Für die wissenschaftliche Betreuung möchte ich mich bei Prof. Dr. Robert Ros bedanken. Er hat einen wichtigen Anteil an der Einarbeitung in die biophysikalischen Techniken und mir mit der Umsetzung des NanoCare-Projektes wichtige Impulse gegeben.
- In gleicher Weise gilt mein Dank Dr. Katja Tönsing, die die NanoCare-Projektleitung von Prof. Dr. Ros übernommen hat und durch Anregungen und Diskussionen entscheidend zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat.
- Die Untersuchungen der GTP-Bindung wären ohne die Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Karsten Niehaus (Fakultät für Biologie) nicht möglich gewesen. Für die Präparation der Proteine und die Diskussion der Experimente danke ich insbesondere Dr. Martina Brecht.
- Mein Dank gebührt allen Partnern des NanoCare Konsortiums, die durch die Bereitstellung und Charakterisierung von verschiedensten Nanopartikeln die Basis für dieses Forschungsvorhaben gelegt haben. Von den Forschungsgruppen möchte ich besonders den Arbeitskreis von Dr. Jürgen Schnekenburger und dort Dr. Alexandra Kroll hervorheben. Die Bereitstellung von Zellkulturen sowie der wissenschaftliche Austausch hatten großen Anteil an der erfolgreichen Durchführung des Projektes.
- Für ihre Arbeiten an Teilbereichen des NanoCare-Projektes möchte ich verschiedenen Personen danken. Ihre Unterstützung hat es ermöglicht, die vielschichtigen Projektziele zu erreichen und auch weiterführende Fragestellungen zu untersuchen. Herr Sebastian Zünkeler hat wichtige kraftspektroskopische Untersuchungen zwischen Nanopartikeln und Zellen durchgeführt. Herrn Nils Flaschel verdanke ich Messungen der Proteinadsorption an Nanopartikeln. Frau Carolin Rademacher hat neue Gerätekomponenten zur Untersuchung von lebenden Zellen getestet und eingeführt. Frau Elisabeth Eilers untersuchte Nanopartikel und Modellmembranen.
- Die Untersuchungen der Bakterienoberflächen sind ein Projekt, das ich gemeinsam mit Herrn Dominik Greif durchgeführt habe. Bei ihm möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit im Labor sowie die Diskussionen bedanken: Immer ein Grund zum Nachdenken – oft auch zum Schmunzeln.
- Für die unkomplizierte Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Andreas Hütten möchte ich ihm sowie Dr. Karsten Rott danken. Sie haben mit modernen Techniken der Elektronenmikroskopie (SEM-EDX) die Ergebnisse dieser Arbeit bereichert.
- Herrn Dr. Sebastian Getfert aus dem Arbeitskreis der Theorie der Kondensierten Materie danke ich für die Beratung zur statistischen Auswertung der Bindungsereignisse von NP auf den Zelloberflächen.

- Bei Fragen zu den eher technischen Aspekten des AFM hat mir Herr Dr. Volker Walhorn zur Seite gestanden. Weiterhin möchte ich ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.
- Herrn Sebastian Horstmeier danke ich für die Unterstützung bei der Benutzung Sputteranlage. Herrn Thorsten Bergman verdanke ich die Einführung am 2PLSM, das mir einige interessante neue Einblicke eröffnet hat. Herrn Dr. Jan Regtmeier möchte ich für die Hinweise bei der Konstruktion des PDMS-Kanals danken.
- Das Schicksal, in einem einsamen Keller arbeiten zu müssen, habe ich mit den Herrn Dr. Heinrich Frey, Dr. Alexander Fuhrmann, Alexander Harder, Michael Birlo, Dr. Tobias Schröder und Matthias Schürmann geteilt, was die Arbeit abseits der übrigen Kollegen erleichtert und zu manchem guten Gespräch geführt hat.
- Wenn ich bei technischen Schwierigkeiten nicht mehr weiter wusste, gab es immer eine Lösung: Christoph! Nicht umsonst trägt er den Namen eines der Heiligen Nothelfer. In gleicher Weise danke ich Frau Gabi Krome für die Unterstützung in den Papierkriegen mit der universitären Bürokratie.
- Ein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biophysik und besonders den Mitbewohnern im Büro für eine kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre während der Arbeit und auch außerhalb.
- In besonderer Weise gilt mein Dank meiner Familie und Freunden, die durch ihr Interesse und aufmunternde Gespräche bei der Fertigstellung dieser Arbeit weitergeholfen haben.

Wenn ich nicht Alexander wäre, dann wollte ich Diogenes sein!

Alexander der Große

