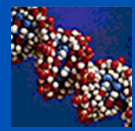


Charakterisierung und Quantifizierung der Wechselwirkungen zwischen einzelnen Nanopartikeln und Zellen

D. Wesner, S. Zünkeler, D. Anselmetti, K. Tönsing

Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaft, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld



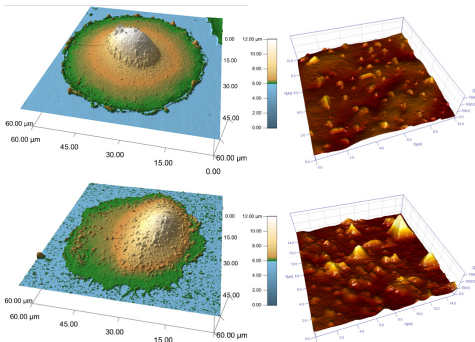
bphysik

Die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln (NP) und Zellen wurde mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht, die eine Charakterisierung der Interaktionen unter nativen Bedingungen ermöglicht. Sowohl die Abbildungen als auch die Kraftspektroskopie zeigen eine Bindung auf der gesamten Zelloberfläche. Die Bindungskräfte betragen ca. 50 pN, wobei sich in Kraft-Distanzkurven die an NP-Aggregaten gebundene Membran zu Tethern ausformt. In Abbildungen sind NP-Aggregate häufig mit Microvilli der Zelle assoziiert, die möglicherweise die Ausgangsbasis der beschriebenen Tether darstellen.

Abbildungen Zelle + NP

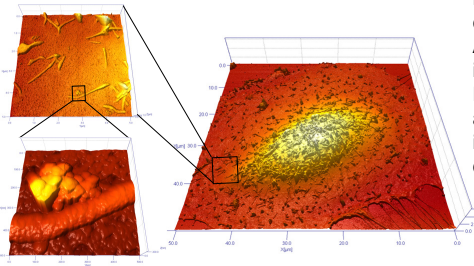
AFM: Zellen in Flüssigkeit

Fixierte Zellen weisen eine raue Struktur mit einer Vielzahl an Protrusionen bis ca. 250 nm auf. Mit NP inkubierte Zellen zeigen viele Erhebungen von bis zu 500 nm und darüber, wobei makroskopisch eine gleichmäßige Verteilung der Bindungsfähigkeit auf der Zelloberfläche feststellbar ist. Aufgrund der Flexibilität der Zelle ist die Auflösung in Flüssigkeit begrenzt.



RLE-6TN-Zellen fixiert in KRP (oben), mit CeO₂ 3.2 inkubiert (unten)

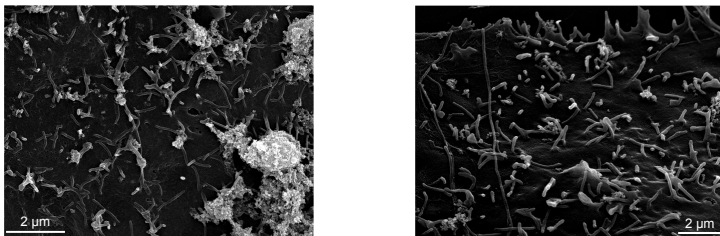
AFM: Zellen dehydriert



Die Trocknung steigert die Stabilität der Zelle, so dass die Protrusionen als Microvilli erkennbar werden und die NP-Aggregate anhand ihrer Form identifiziert werden können. Häufig sind diese mit den Villi assoziiert, was eine Bindung insbesondere an der Membran dieser Strukturen nahe legt.

A549-Zellen mit CeO₂ 3.2 (filtriert Poren 200 nm) inkubiert, fixiert, getrocknet

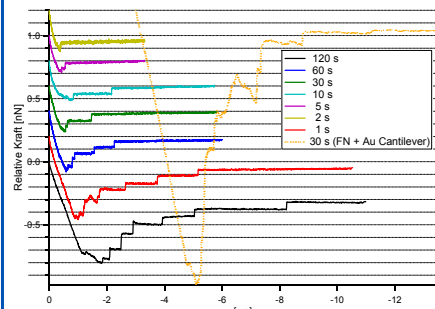
REM: Zellen dehydriert



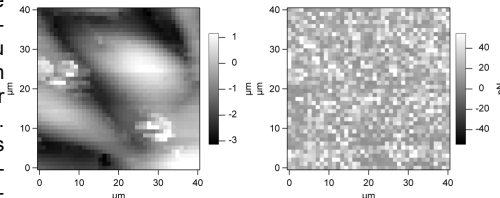
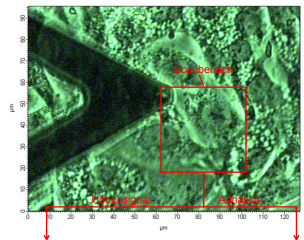
NP wurden mittels Sedimentation oder durch Vorbeiströmen der Dispersion in Kontakt zu Zellen gebracht. Die Anzahl und der maximale Durchmesser der gebundenen Aggregate sind bei sedimentierten NP größer. Die an der Membran gebundenen Aggregate sind in der Regel in Kontakt mit Microvilli.

RLE-6TN mit CeO₂ 3.2 inkubiert durch
• Sedimentation (links)
• Vorbeiströmen der Dispersion (rechts)

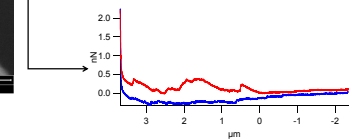
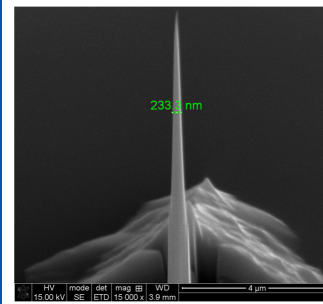
Kraftspektroskopie



Die Abbildung zeigt typische Kraftdistanzkurven zwischen NP (TiO₂, CeO₂ und unmodifizierte SiN-Cantilever) und lebenden RLE-6TN Zellen in Abhängigkeit von der Kontaktzeit. Es wird deutlich, dass die Zahl der Abrisse mit der Kontaktzeit korreliert und die meisten Abrisskräfte im Bereich von 50 pN liegen. Dabei handelt es sich um Bindungen, die auch mehrere µm von der Zelloberfläche entfernt zu beobachten sind und auf die Bildung von Membran-Tethern schließen lassen. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich für SiN-Cantilever die mit dem Adhäsionsprotein Fibronectin (FN) inkubiert wurden. Erst die Verwendung von Kraftsensoren mit einer Goldschicht, an die das FN kovalent binden kann, führt zu wesentlich größeren Abrisskräften. Darüber hinaus wurde untersucht, ob verschiedene Bereiche einer Zelle unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Dazu wurden Messungen im Force Volume Mode (über ganze Zellen) ausgeführt. Mit Hilfe des daraus resultierenden Höhensignals lassen sich die Konturen der Zellen erkennen und es wird deutlich, dass die Adhäsion keine Abhängigkeit von der Position zeigt. Die verwendete Technik zur Immobilisierung von NP an Kraftsensoren hat den Nachteil, dass die Kontaktfläche zur Zelle mit zunehmender Eintauchtiefe schnell größer wird. Dadurch dringt der Kraftsensor nicht in die Zelle ein, sondern deformiert diese in den meisten Fällen. Dieses Problem lässt sich mit der Verwendung von Nanonadeln umgehen, die mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls hergestellt werden können und bereits bei kleinen Kräften in die Zelle eindringen ohne den Zelltod zu verursachen.



Die verwendete Technik zur Immobilisierung von NP an Kraftsensoren hat den Nachteil, dass die Kontaktfläche zur Zelle mit zunehmender Eintauchtiefe schnell größer wird. Dadurch dringt der Kraftsensor nicht in die Zelle ein, sondern deformiert diese in den meisten Fällen. Dieses Problem lässt sich mit der Verwendung von Nanonadeln umgehen, die mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls hergestellt werden können und bereits bei kleinen Kräften in die Zelle eindringen ohne den Zelltod zu verursachen.



Zusammenfassung

- Bindungsaffinität für NP-Aggregate auf der ganzen Zelloberfläche makroskopisch gleichmäßig verteilt
- Bindungskraft zwischen Membran und NP-Aggregaten ca. 50 pN unabhängig von Material der NP
- NP-Aggregate häufig mit Microvilli assoziiert
- Ausbildung von Membranschläuchen (Tether) zwischen NP und Zelle (bei Kraftspektroskopie)
- Mögliche Erklärung: Zellmembran insbesondere der Microvilli bindet NP, Streckung der Microvilli zu Tethern

Supported by:



Universität Bielefeld