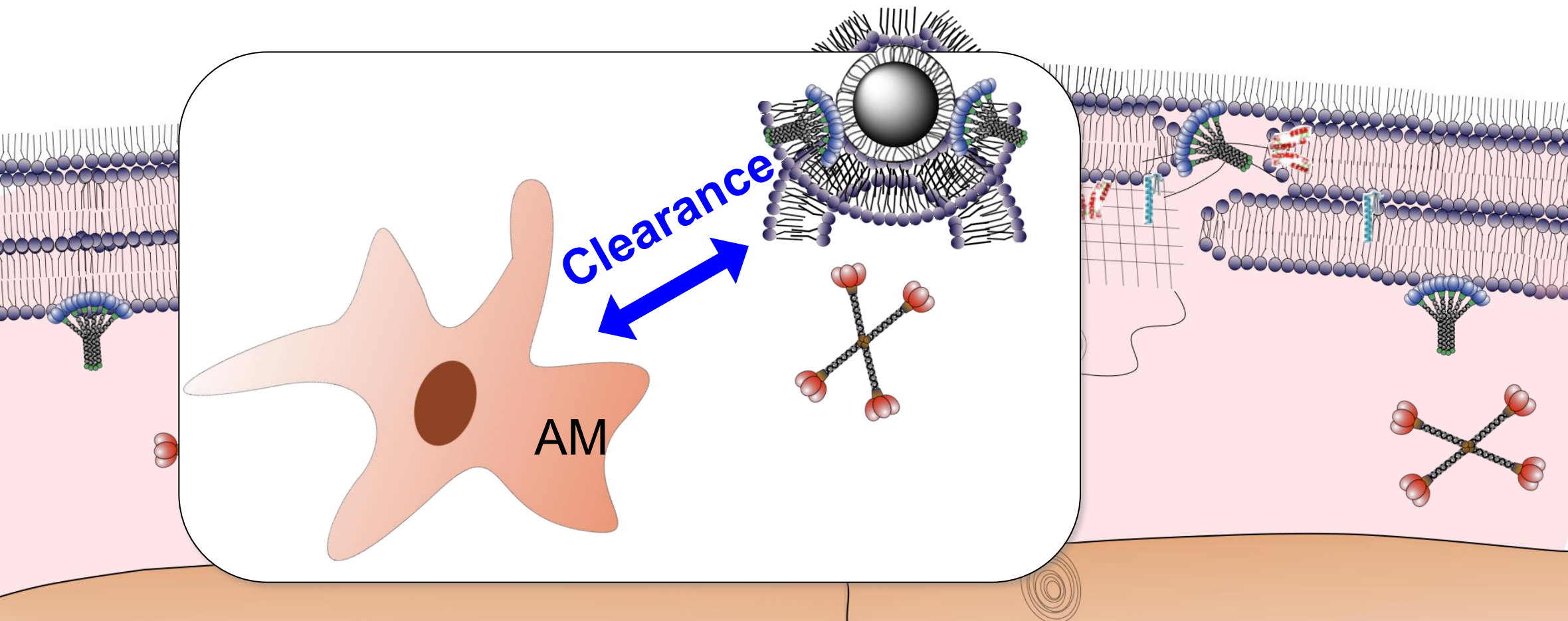


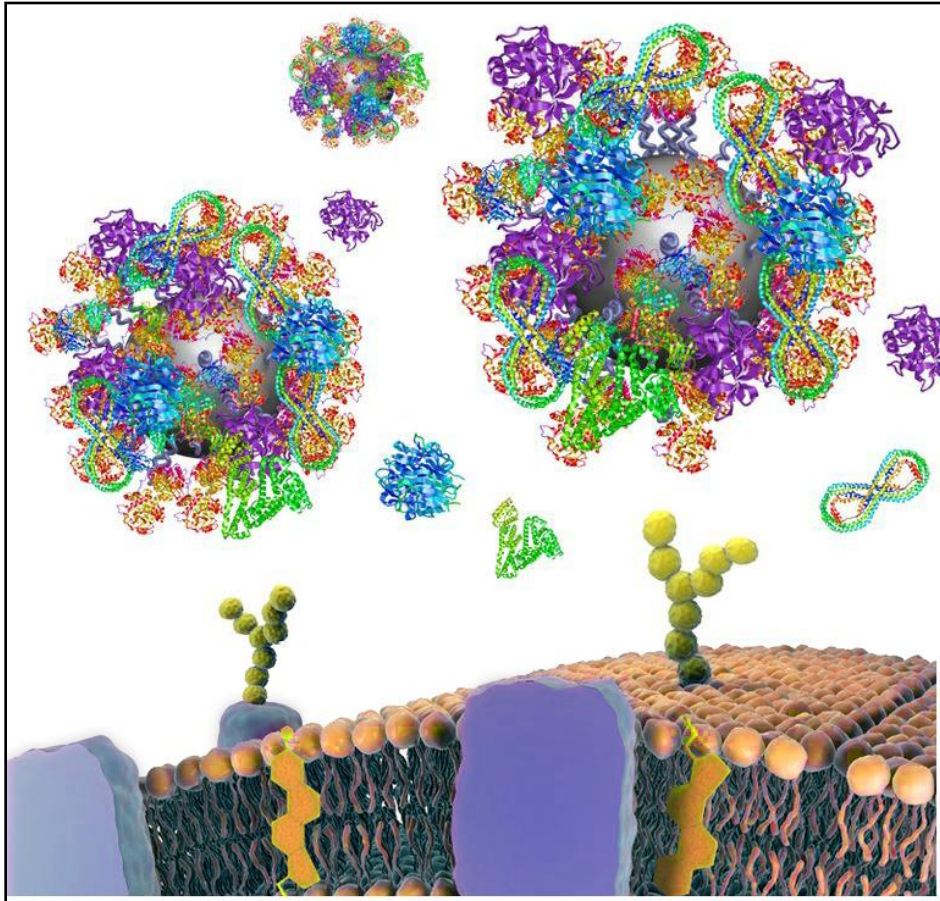
## **APQ: Veränderungen von Nanomaterialien- Agglomerationsgrad, Adduktbildung und Konditionierung**

Andrea Haase (BfR) und Wendel Wohlleben (BASF)  
und alle APQ Partner



- 1) Deposition
- 2) Immersion
- 3) Interaktion mit Surfactantmolekülen („Corona“- Bildung)
- 4) Zelluläre Wechselwirkung & Response












Nanomaterialien (NM) verändern sich :

- 1) **der Oberfläche** (z.B. Adsorption von Biomolekülen)
- 2) **des Agglomerationsgrads**
- 3) **einige NM können sich (partiell) auflösen**

Monopoli MP, et al Nat Nanotechnol. 2012 Dec;7(12):779pp

**Hypothese:**  
**In situ Charakterisierung ermöglicht Beschreibung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.**

|  | <u>Agglomerationsverhalten</u><br>(Wasser, PBS, DMEM + FKS,<br>Lipide, Curosurf™, Surfactant) | <u>Interaktion mit Proteinen, Lipiden</u><br>(DMEM +FKS,<br>Lipide, Curosurf™, Surfactant) |
|--|---|--|
|    | Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)<br>Elektronenmikroskopie                                | 2D Gelanalysen<br>Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS)                                  |
|    | Dynamische Lichtstreuung (DLS)  | 1D & 2D Gelanalysen<br>MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie                                   |
|    | Nanopartikel Tracking Analyse (NTA)   |  |
|   | Dynamische Lichtstreuung (DLS)  | 1D Gelanalysen<br>Agilent Lab-on-a-Chip System   |
|  |   | Elektronenmikroskopie (SEM, AFM)<br>Filmwaage<br>Dünnschichtchromatographie                |
|  | Elektronenmikroskopie   | Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS)  |
|  | Nanopartikel Tracking Analyse (NTA)<br>Analyse der Sedimentationskinetik                      |  |

# Untersuchung in Lipiden

## 1) Lipide einzeln

DPPC, DOPC, DPPG, DOPG

## 2) Lipidmischung

DPPC: DOPC: DPPG (40:40:20)

## 3) CuroSurf™

hydrophober Lungenextrakt (SP-B, SP-C)

## 4) aufgereinigtes Lungensurfactant (Schwein)

zusätzlich auch hydrophile Surfactantproteine (SP-A, SP-D)

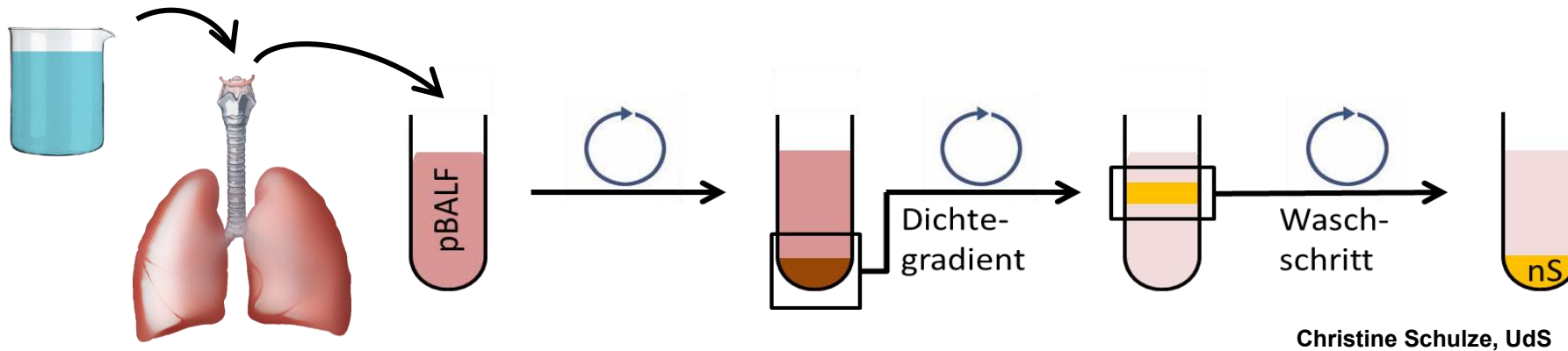
## 1) Agglomeration

## 2) Interaktion mit Lipiden & Surfactantproteinen

|      |   |
|------|---|
| DPPC | 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (zwitterionic) |
| DOPC | 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (zwitterionic)         |
| DPPG | 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (anionic)     |
| DOPG | 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (anionic)        |



# Natives Surfactant (Schweinelunge)



| PC [mM] | PE [mM] | PG [mM] | PI [mM] | PL [mM] | Gesamtprotein [mg/ml] | SP-A [mg/ml] |
|---------|---------|---------|---------|---------|-----------------------|--------------|
| 31,35   | 3,15    | 1,71    | 0,3     | 37,56   | 5.1                   | 0.358        |

Pool aus 6 Einzelisolationen

## Surfaktantproteine:

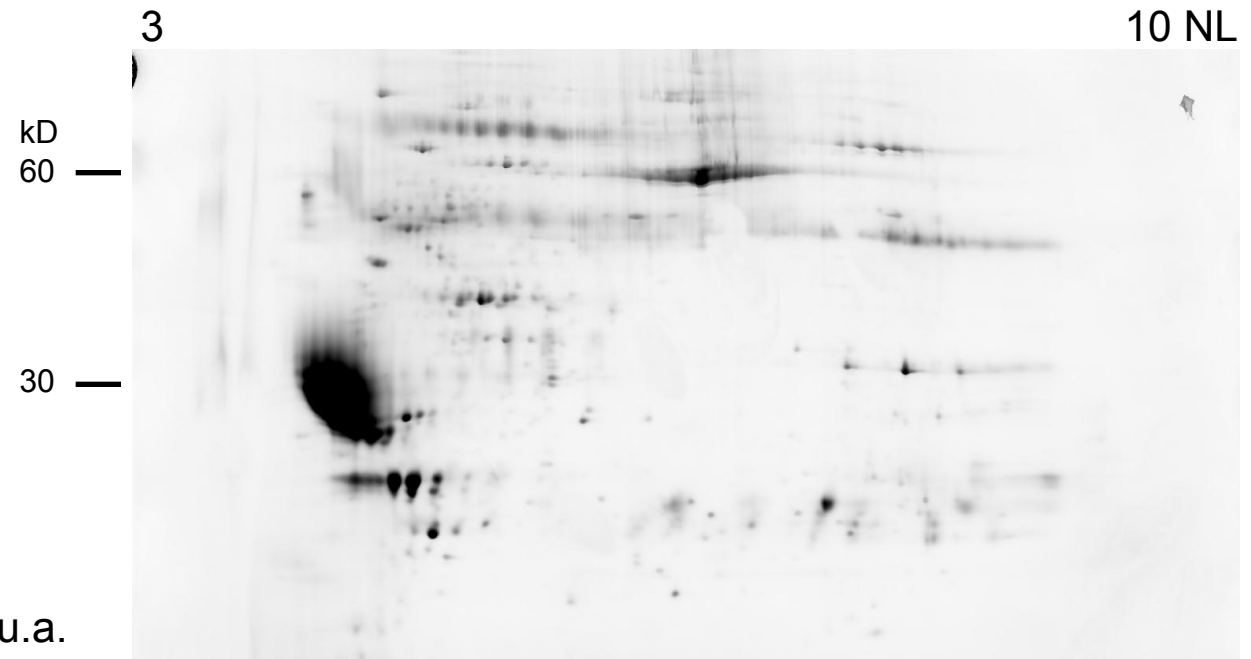
SP-A, SP-D

## Serumproteine:

Albumin, diverse Ig's, Serotransferrin, Antithrombin, Ficolin, Vit D binding protein, Apolipoprotein A-IV, Hämoglobin, Haptoglobin u.a.

## Intrazelluläre Proteine:

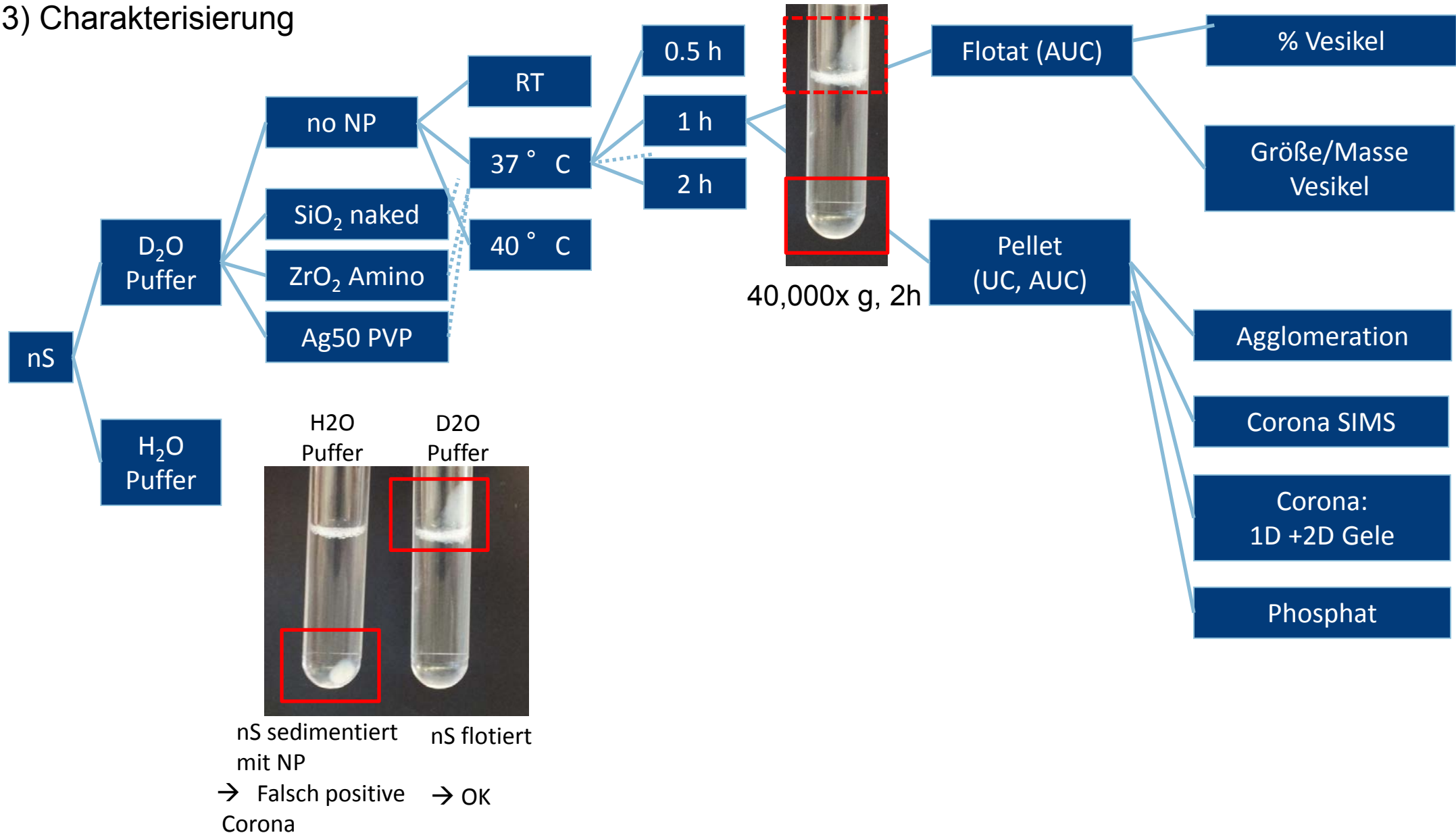
Aktin, Tubulin, Gelsolin, PDI, ATP Synthase, Annexin u.a.



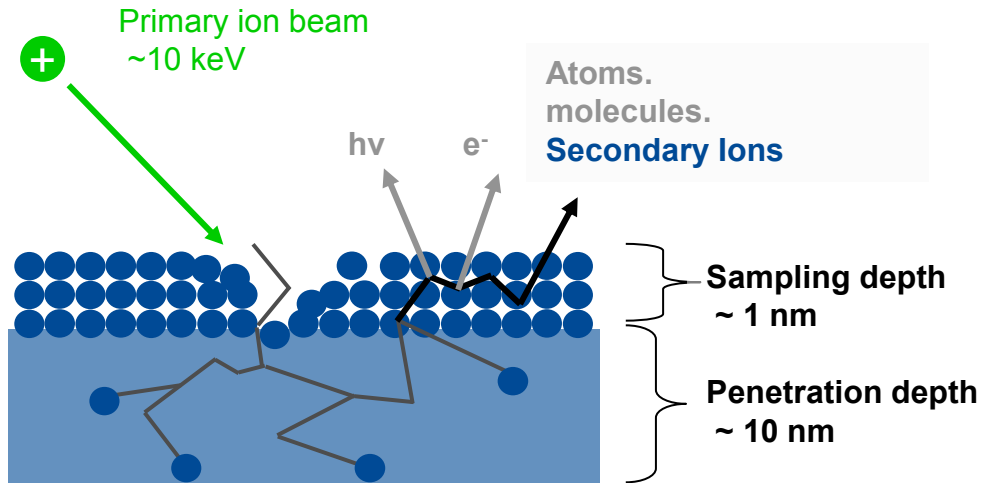
1) Inkubation

2) Separation von nicht- adsorbierten Lipidvesikeln

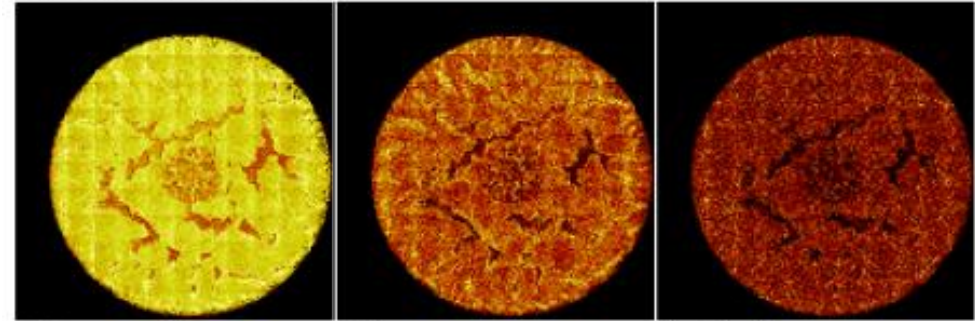
3) Charakterisierung



# Identifikation von Surfactantkomponenten: SIMS



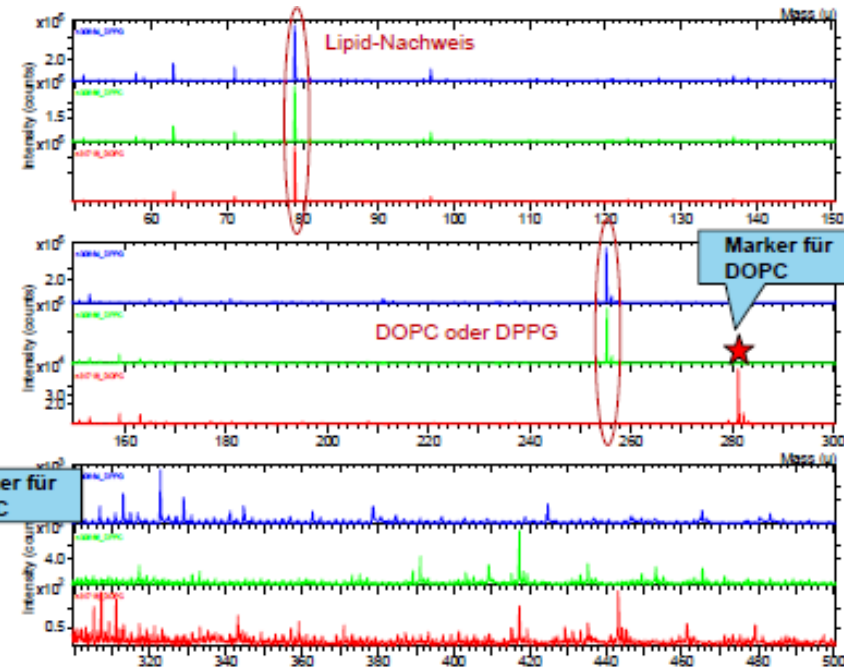
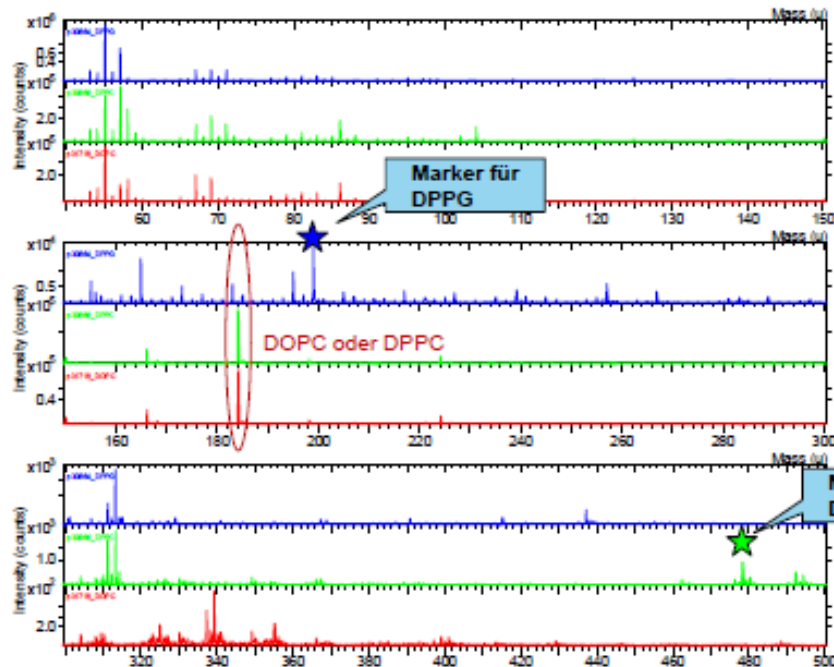
144112 Wohlleben: Curosurf in D2O --- n31390\_1  
(4800  $\mu\text{m}^2$ ); 1x50 scans



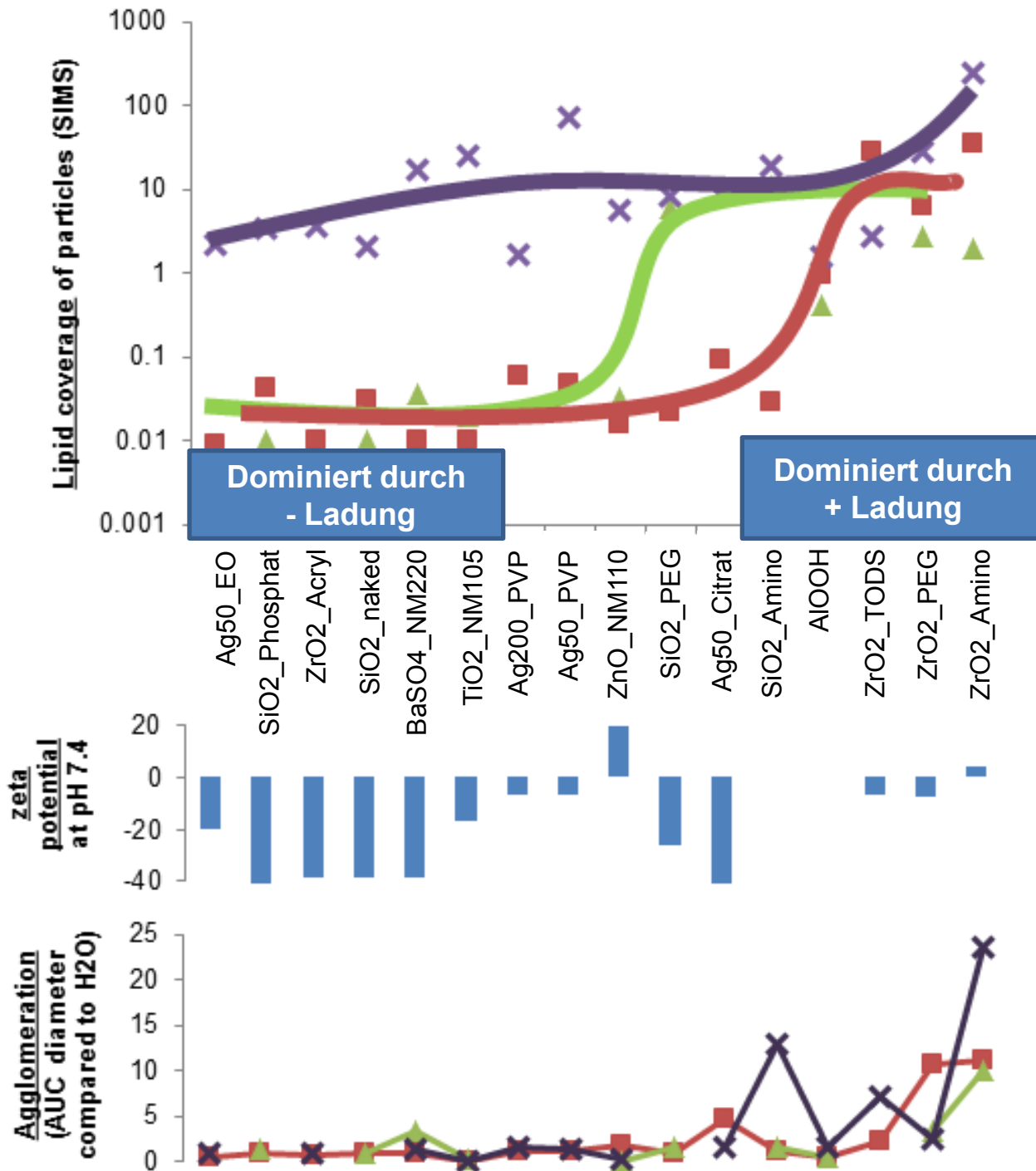
total  
mc:486 tc:1.14e+7

$\text{PO}_3^-$   
mc:38 tc:6.02e+5

$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2^-$   
mc:17 tc:1.75e+5







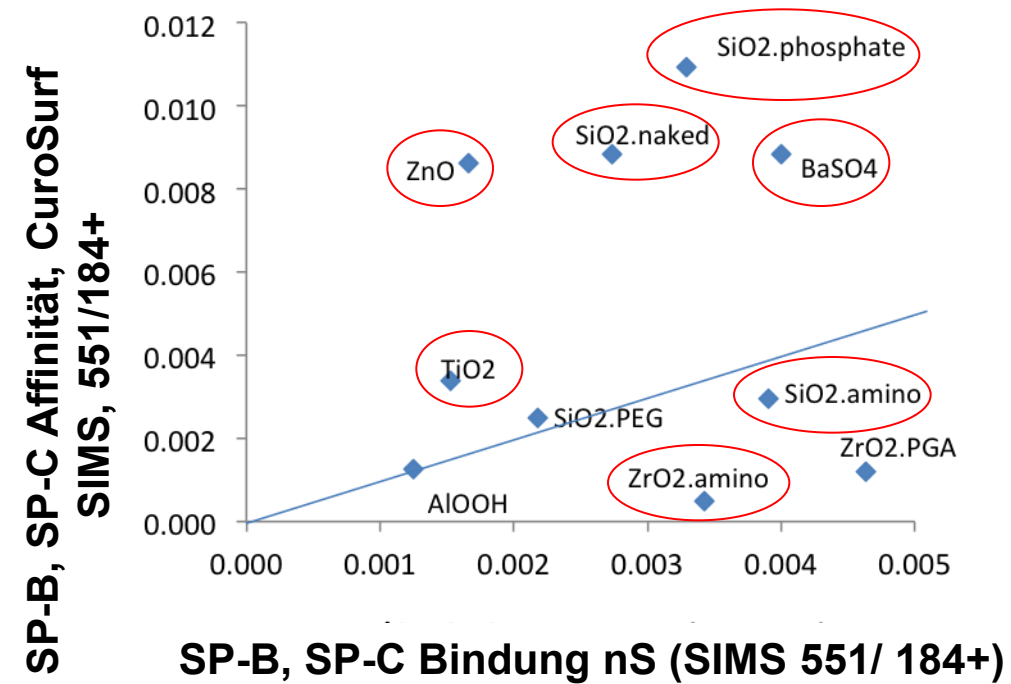
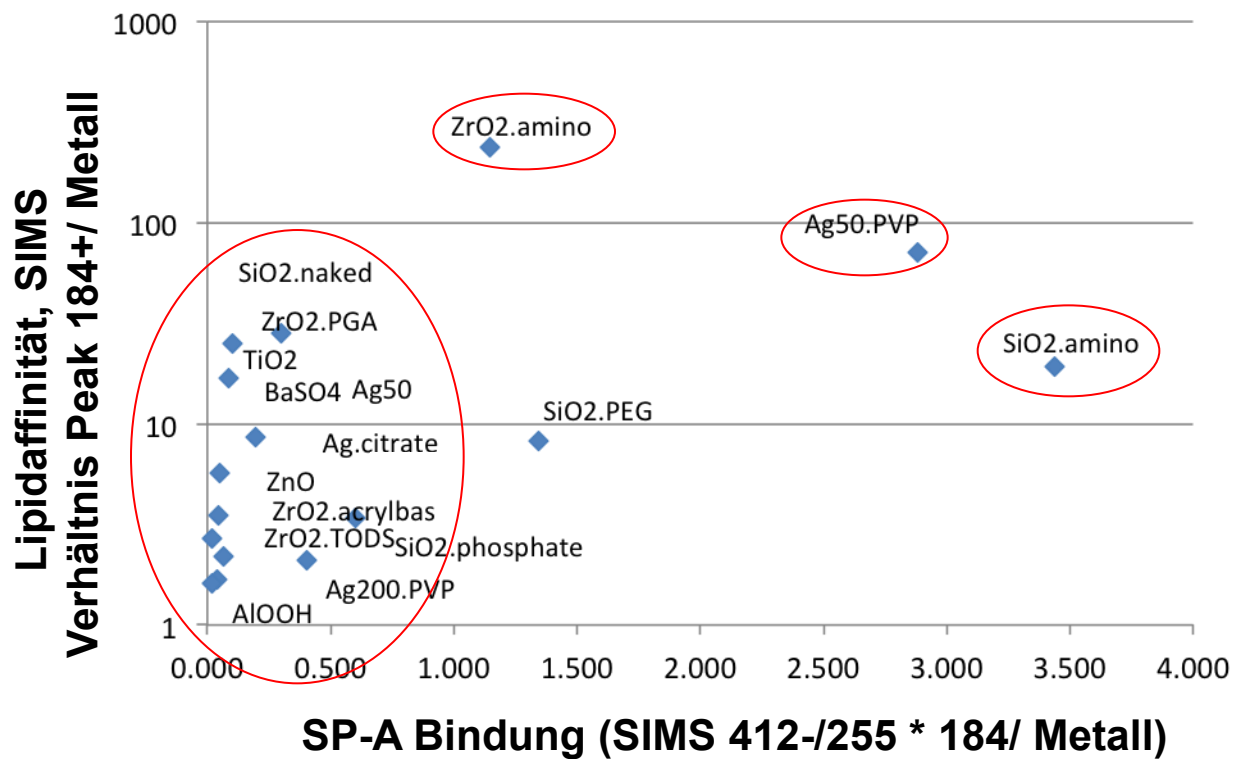
Für 11 von 16 NP:  
Ladung entscheidet über Lipidinteraktion

Für einige gibt es spezifische WW  
(Ag50 EO, Ag50 Citrate, SiO2 PEG, ZnO)

- Lipide: DPPC, DOPC, DPPG (40:40:20)
- Natives Surfactant (SP-A)
- CuroSurf (SP-B, kein SP-A)

→ SP-A kann Lipidinteraktion vermitteln, d.h. verstärken (nicht SP-B)

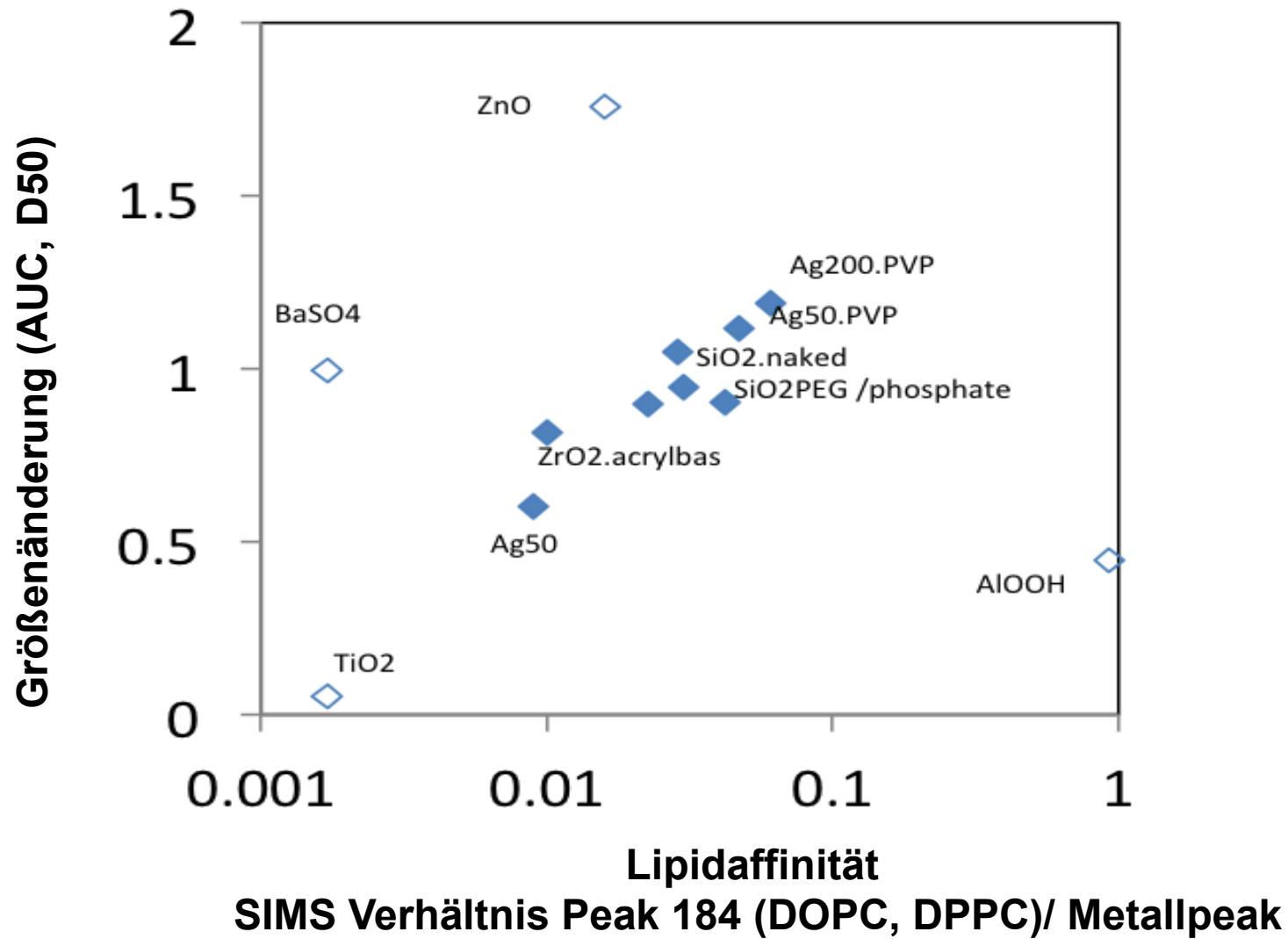
Compare Ruge, Lehr et al. on cellular uptake mediated by SP-A, PLoS 2012)

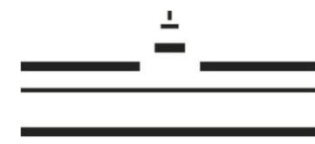


NP mit **geringer SP-A Affinität (nS)** binden **mehr SP-B (Curosurf)** aber **weniger Lipid pro SP-B**.

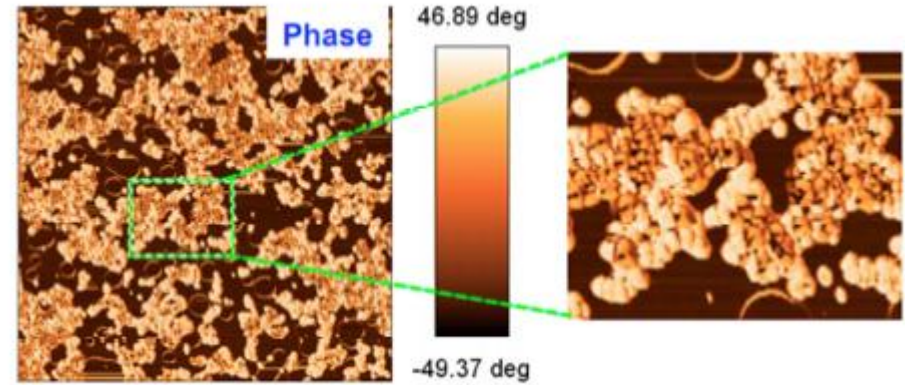
NP mit **hoher SP-A Affinität (nS)** binden **mehr SP-B pro Lipid** wenn **SP-A** anwesend ist.

In beiden Gruppen gibt es NP mit hoher & niedriger Lipidbindung

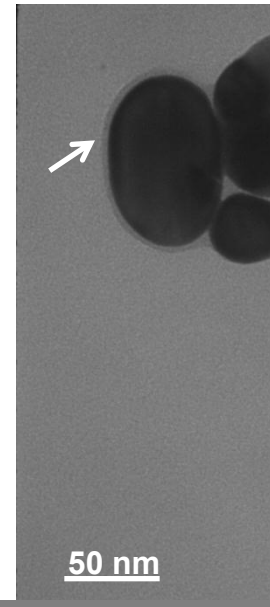
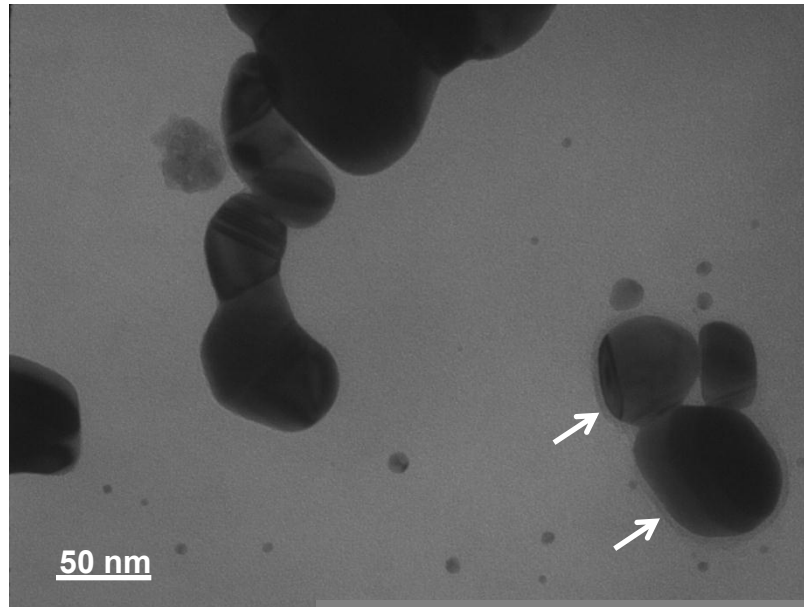




# Inhomogene, spärliche Umhüllung



DPPC

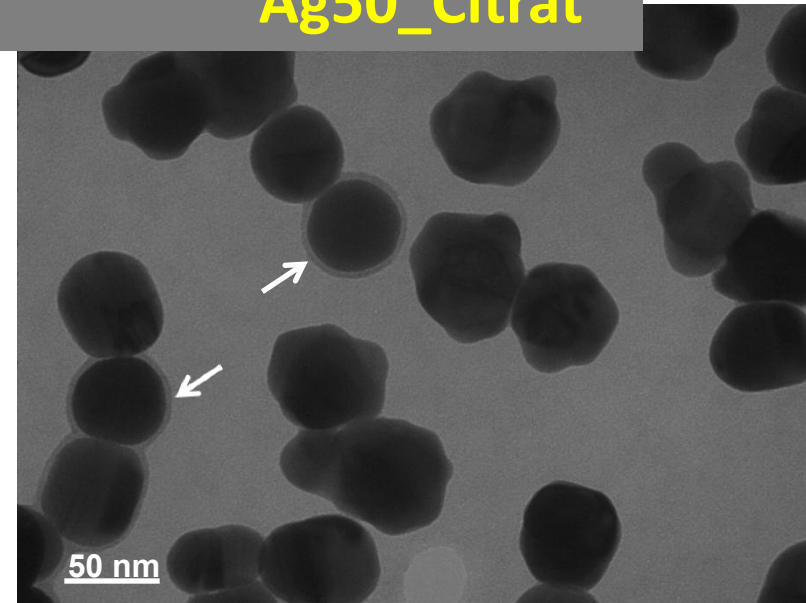
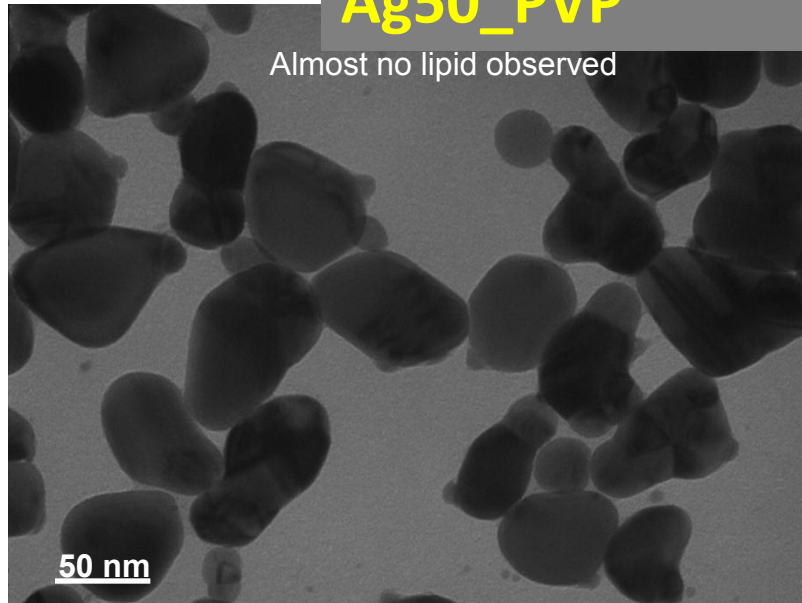


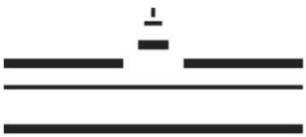
Ag50\_PVP

Almost no lipid observed

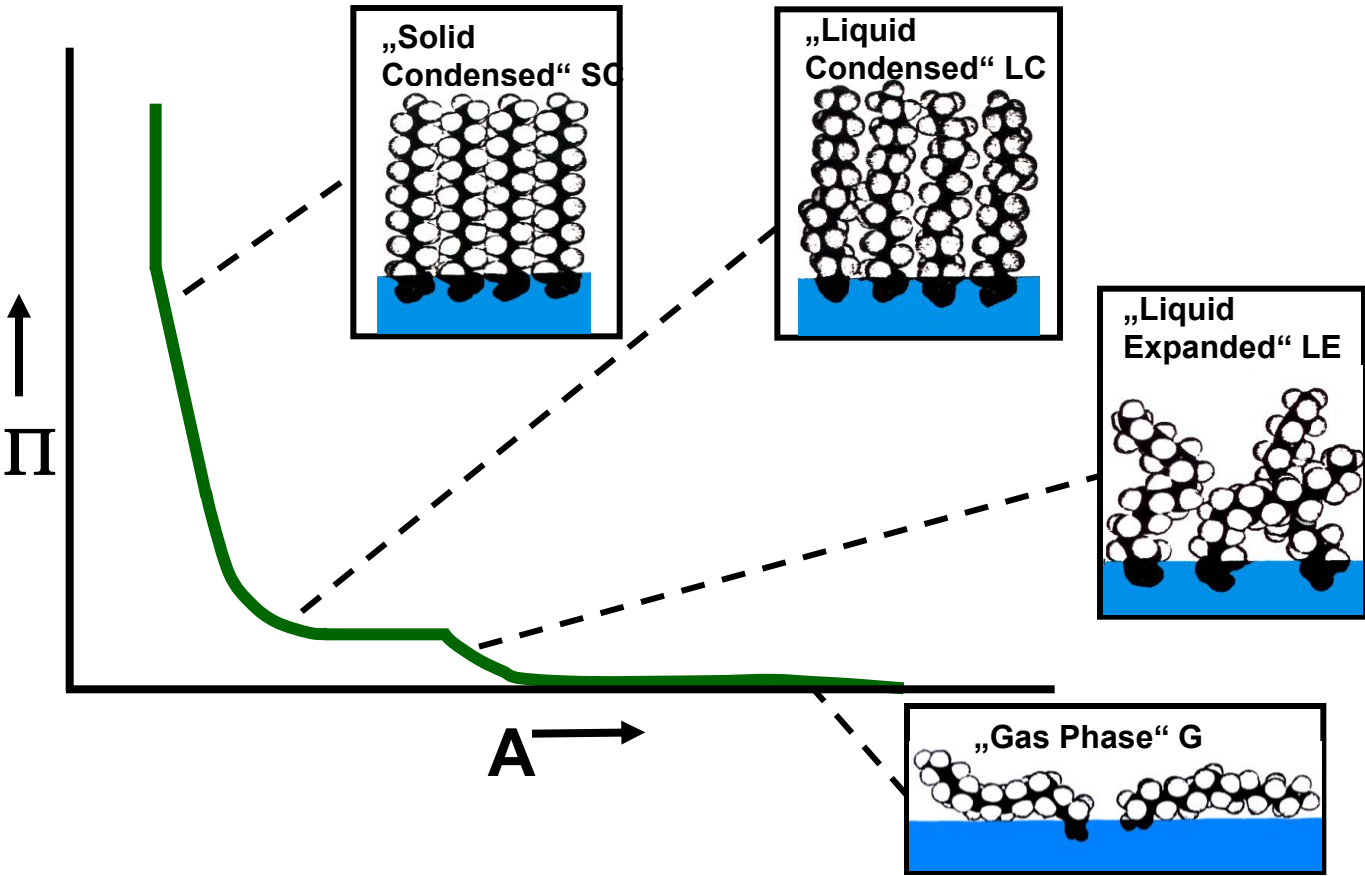
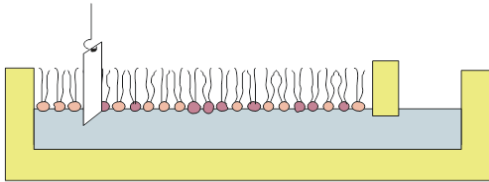
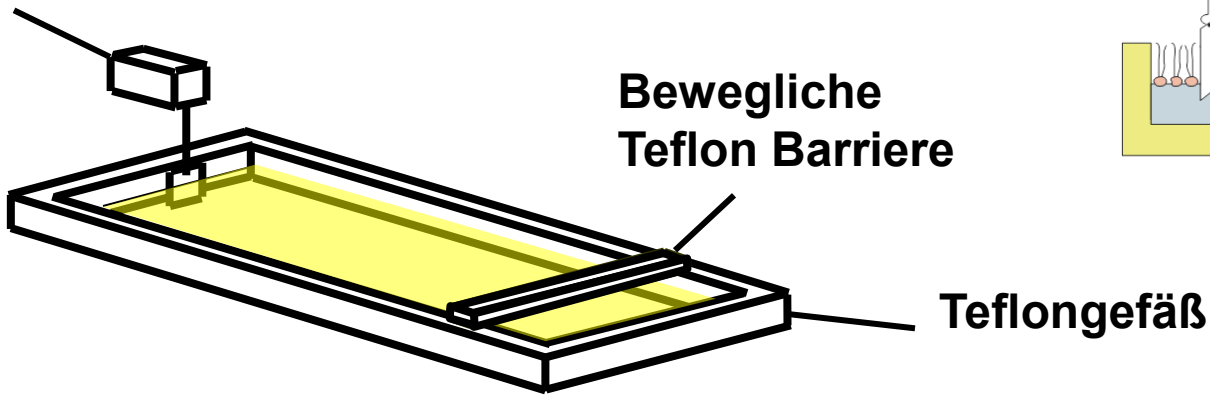
Ag50\_Citrat

DPPG





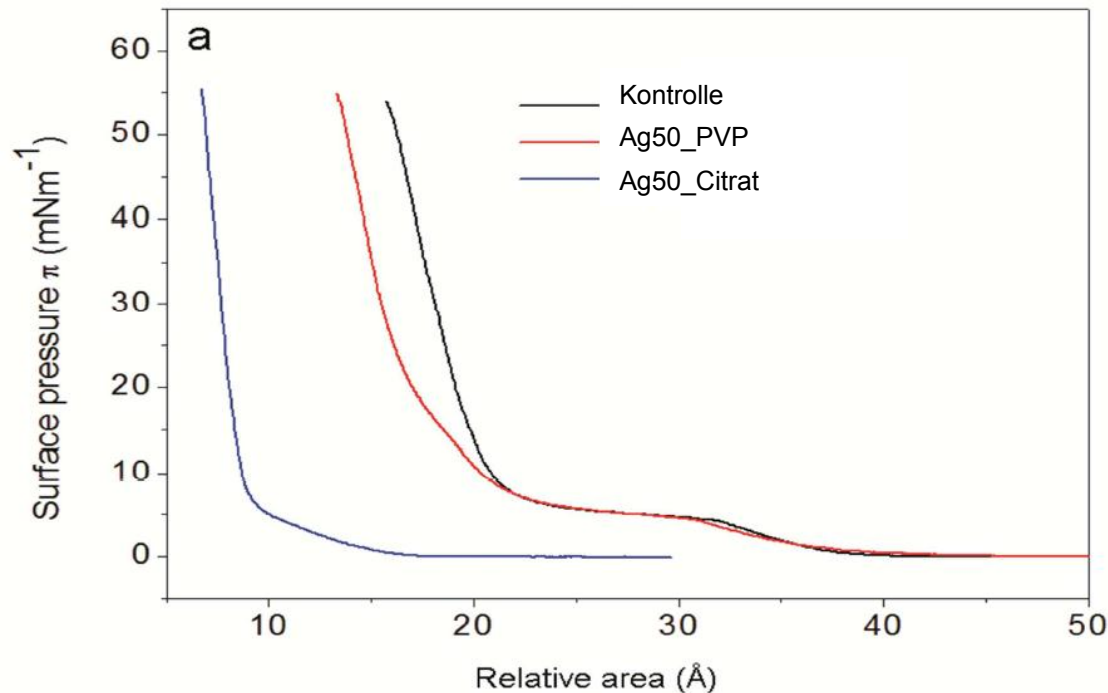
## Wilhelmy system





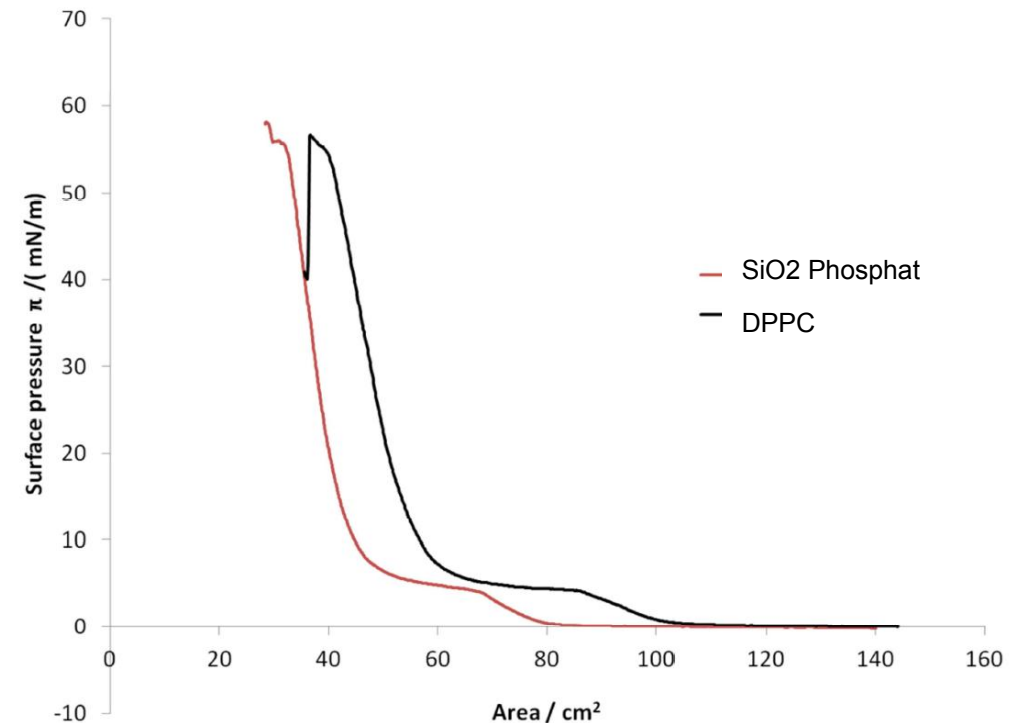


## Ag50\_PVP, Ag50\_Citrat in DPPC

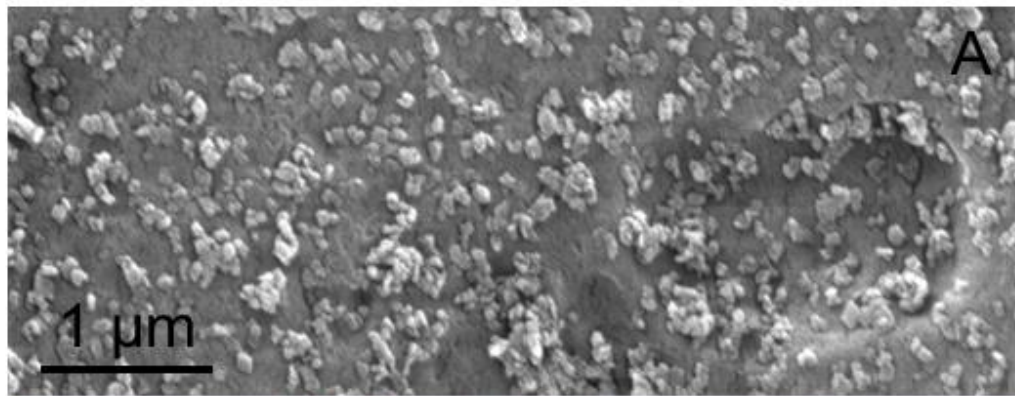


- DPPC desorbiert von Ag50\_PVP, formt intakten Monolayer (I<sub>e</sub> – I<sub>c</sub> Phasenübergang)
- Wenige NP an Luft/ Wasser Grenzfläche
- nur Ag50\_Citrat behalten partielle Lipide und stören die Ausbildung eines Monolayer (desorbieren nach wiederholter Kompression und Expansion)

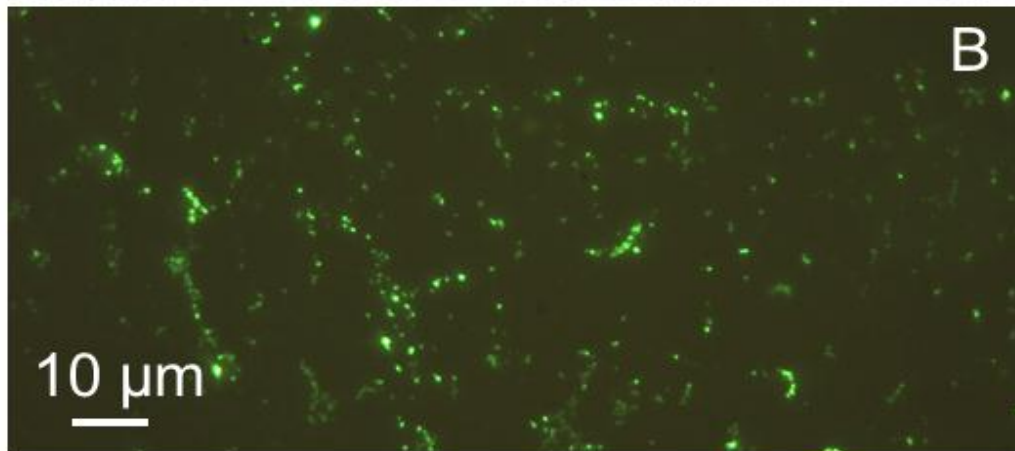
## SiO<sub>2</sub> Phosphat in DPPC



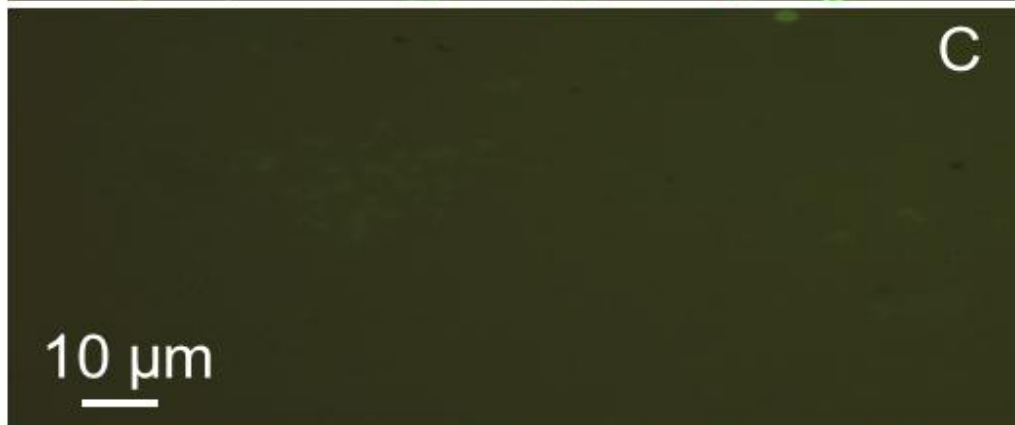
- DPPC desorbiert von NP, formt intakten Monolayer (Phasenübergänge)
- Alle SiO<sub>2</sub> Varianten verlieren partielle Corona komplett an Luft- Wasser Grenzfläche (keine Veränderung bei Kompressionszyklen)



AIOOH dispergiert in ddH<sub>2</sub>O mit Ultraschall (SEM)  
→ Oberfläche gut zugänglich



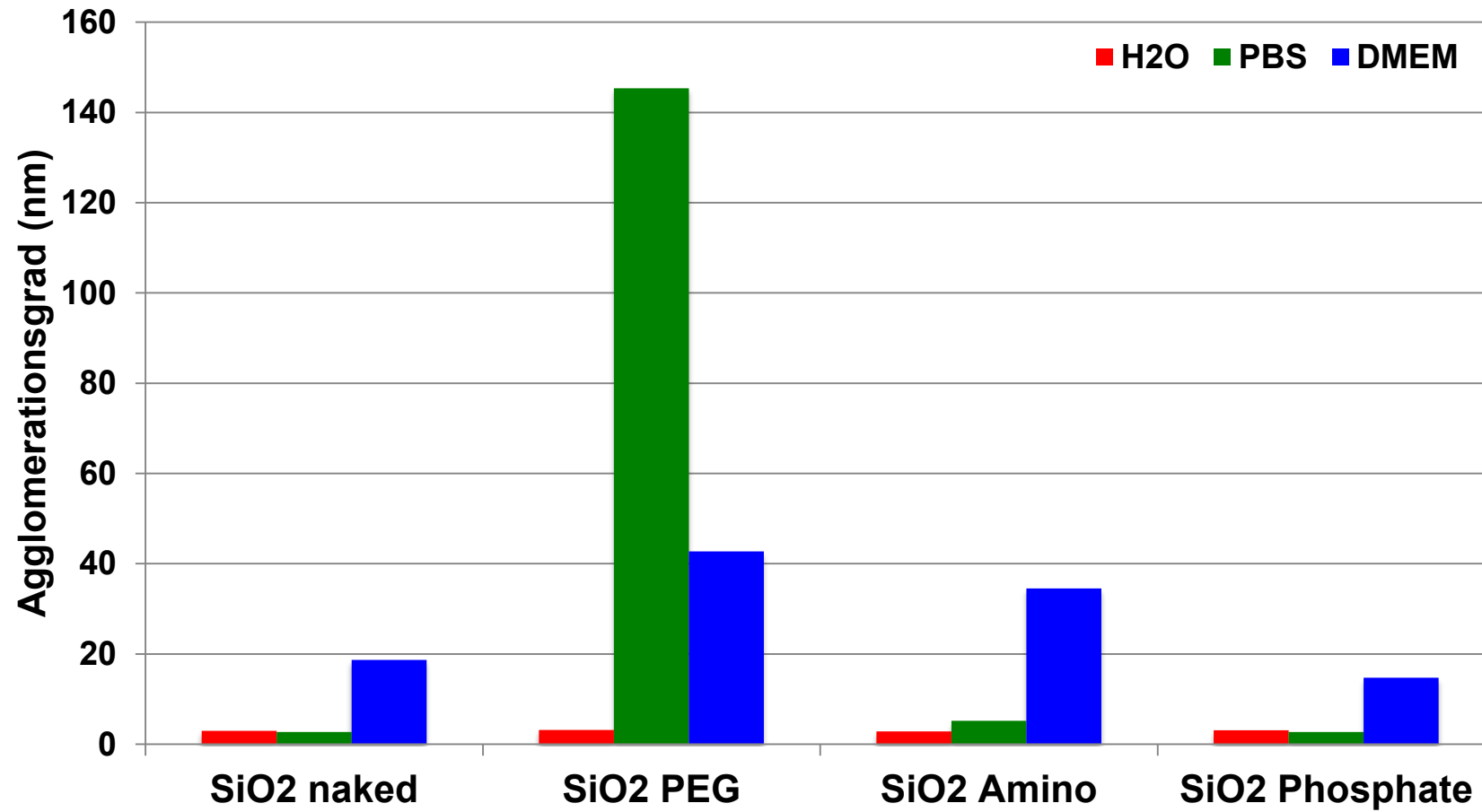
Fluoreszierende Lipide (BODIPY-PC) binden an  
Oberfläche der AIOOH NP  
→ Grün fluoreszierende NP

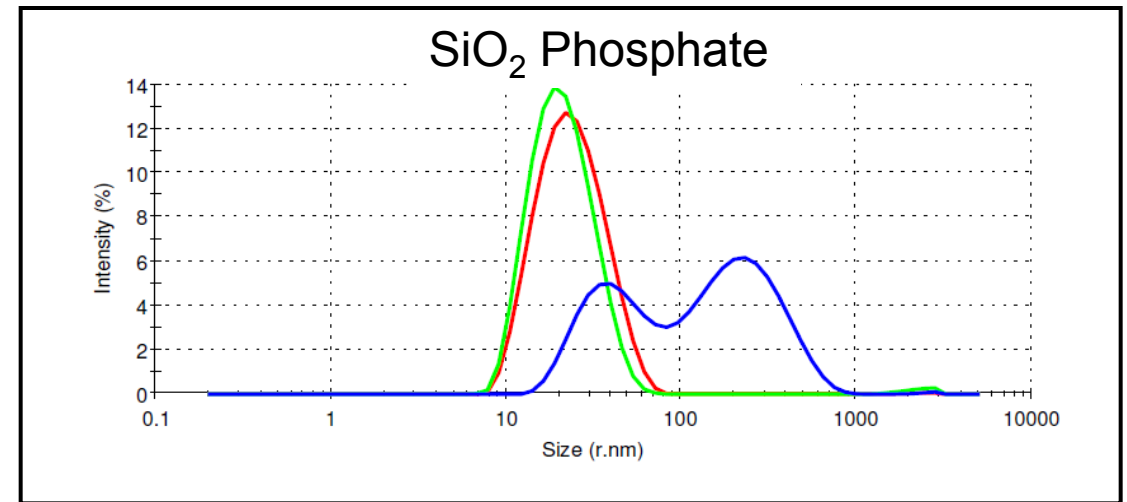
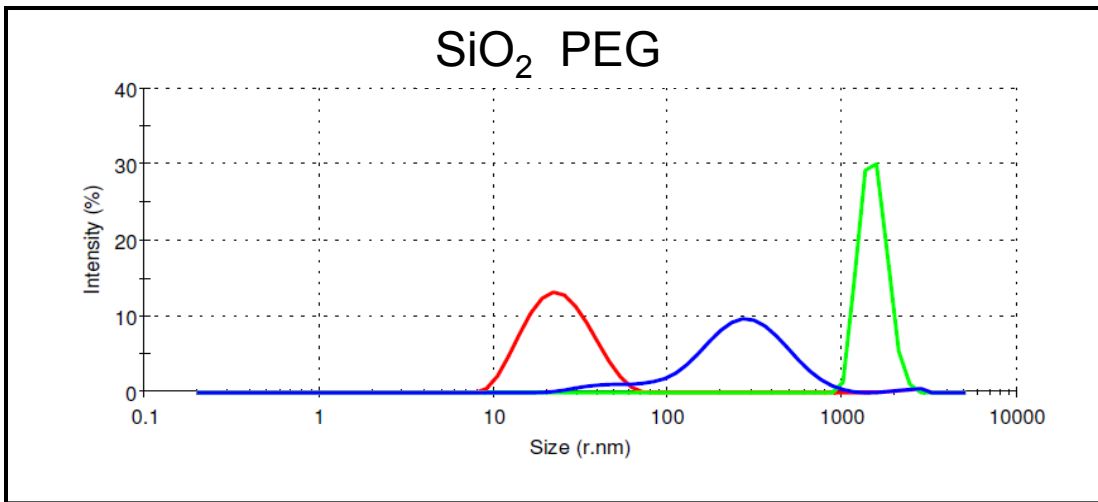
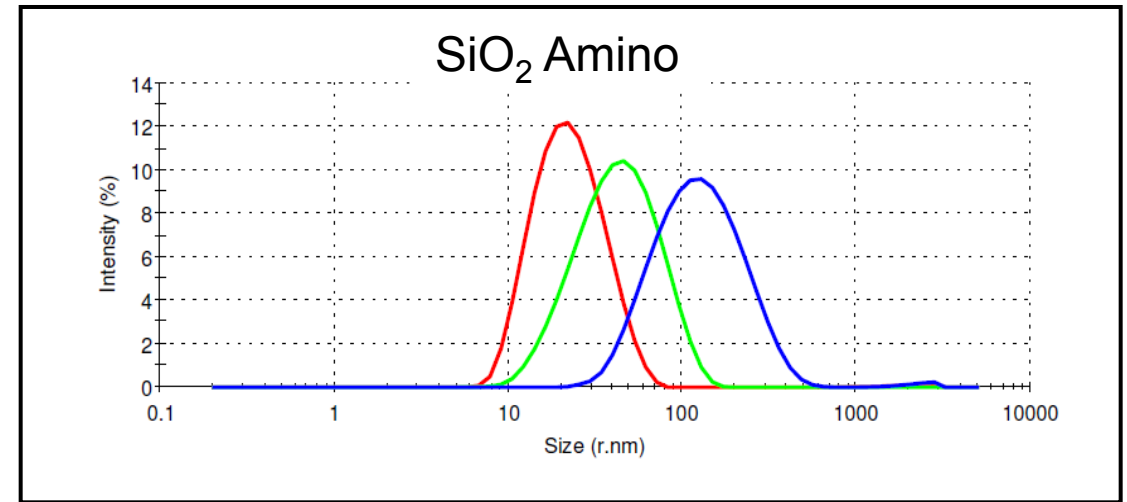
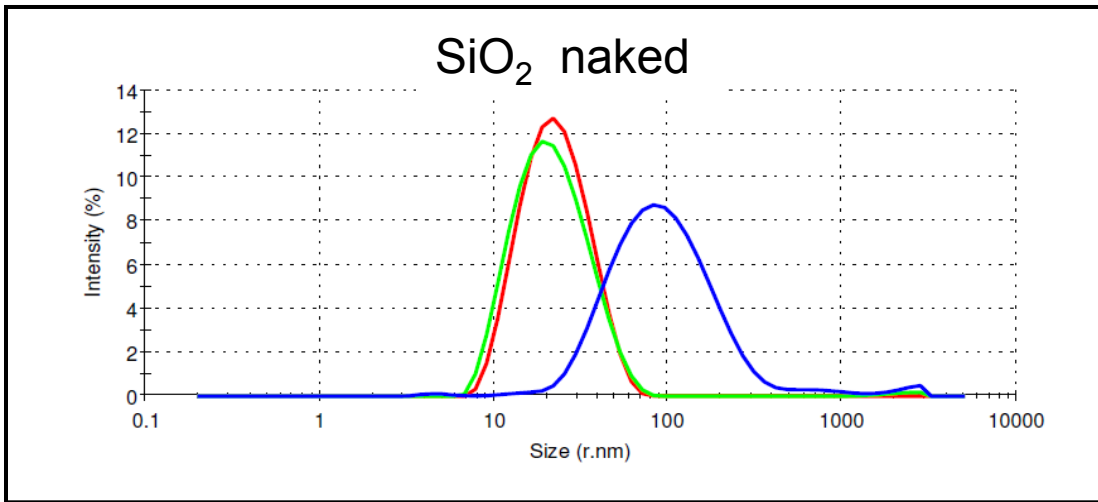


Zugabe von BSA (10 mg/ml)  
→ NP binden BSA, Lipid desorbiert innerhalb von  
wenigen Minuten

# **Zellkulturmedium (DMEM mit 10% fötalem Kälberserum, FKS)**

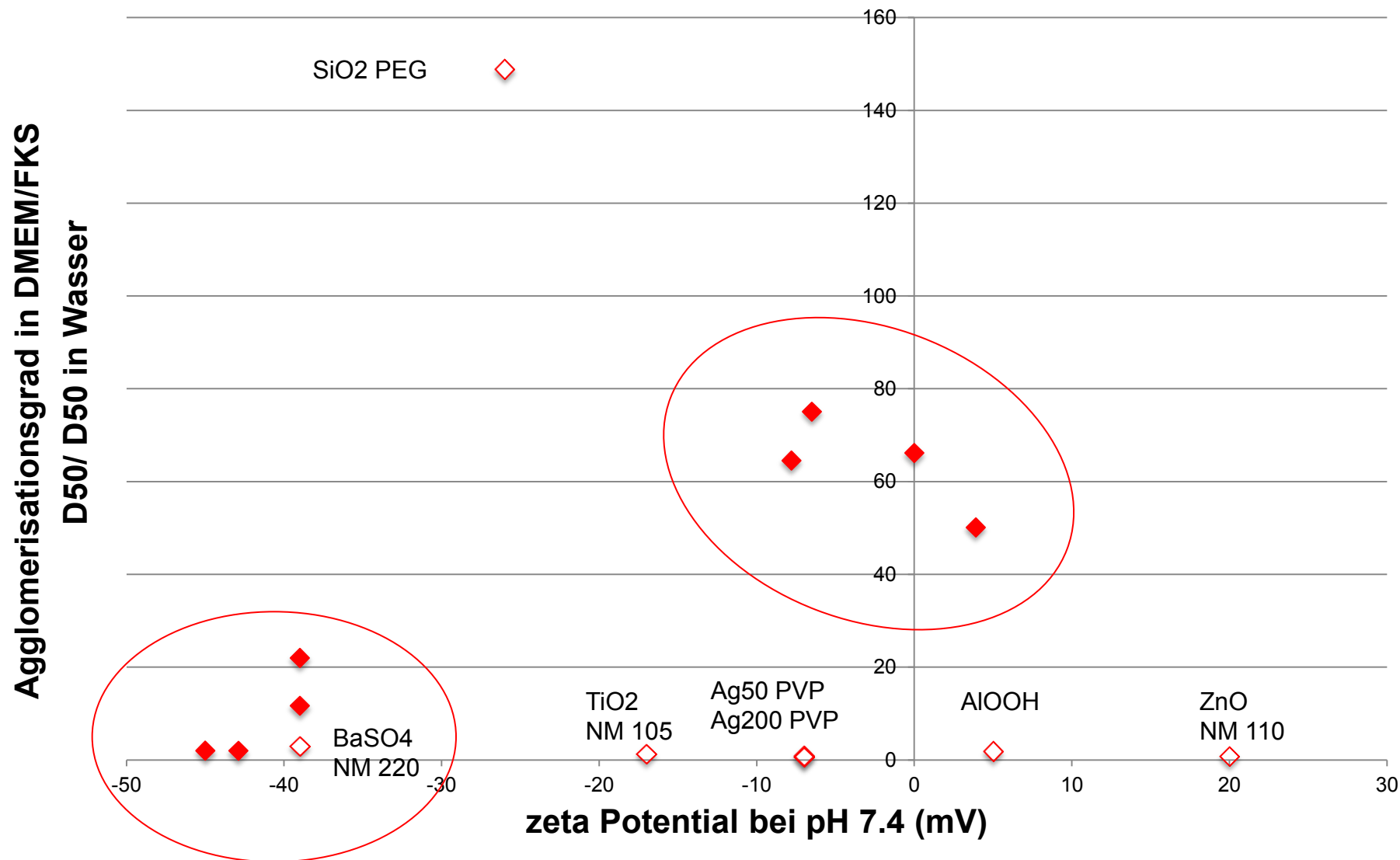
- 1) Agglomeration**
- 2) Interaktion mit Serumproteinen**





— Wasser — PBS — DMEM+ 10% FKS





## Ausnahmen:

SiO<sub>2</sub> PEG

Ag50 PVP/ Ag200 PVP

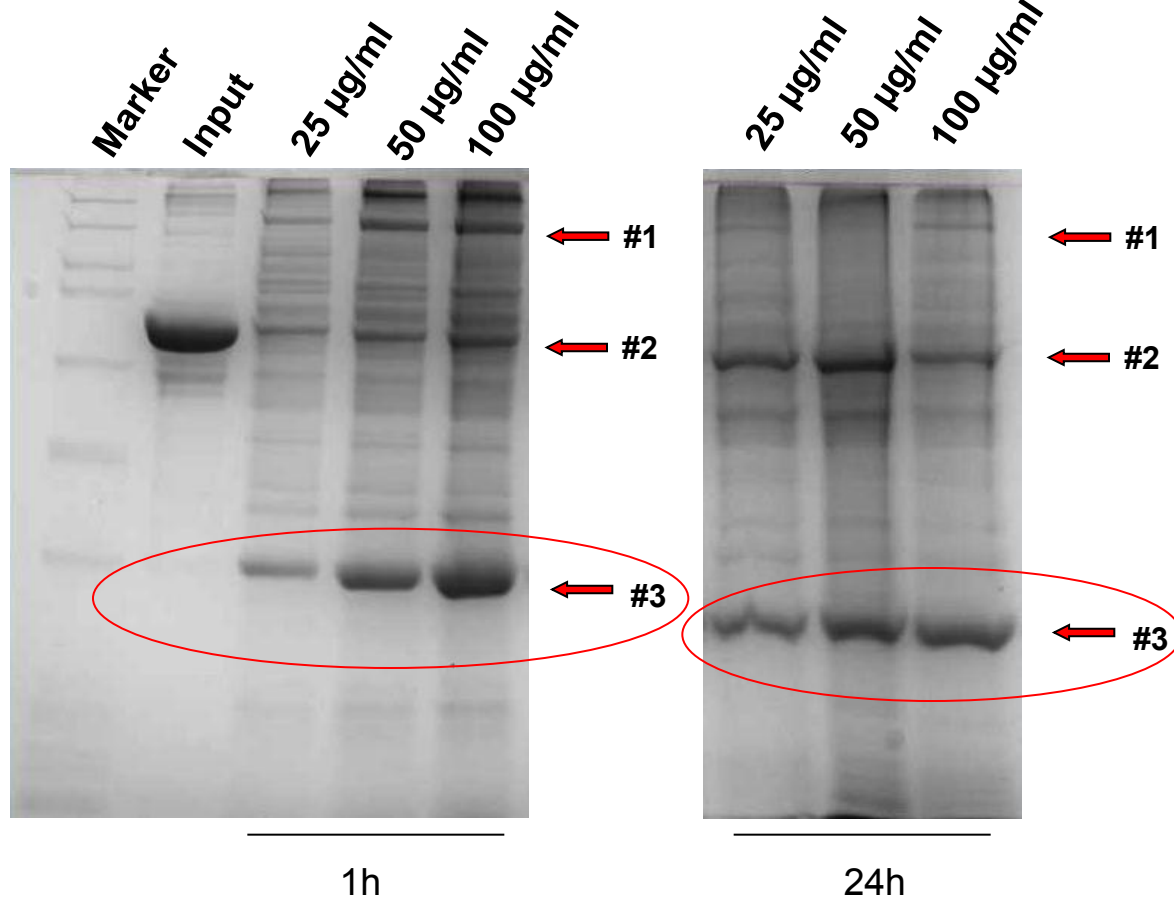
Pulvermaterialien (TiO<sub>2</sub> NM105, ZnO NM110, BaSO<sub>4</sub> NM 220, AlOOH)

sterisch stabilisiert

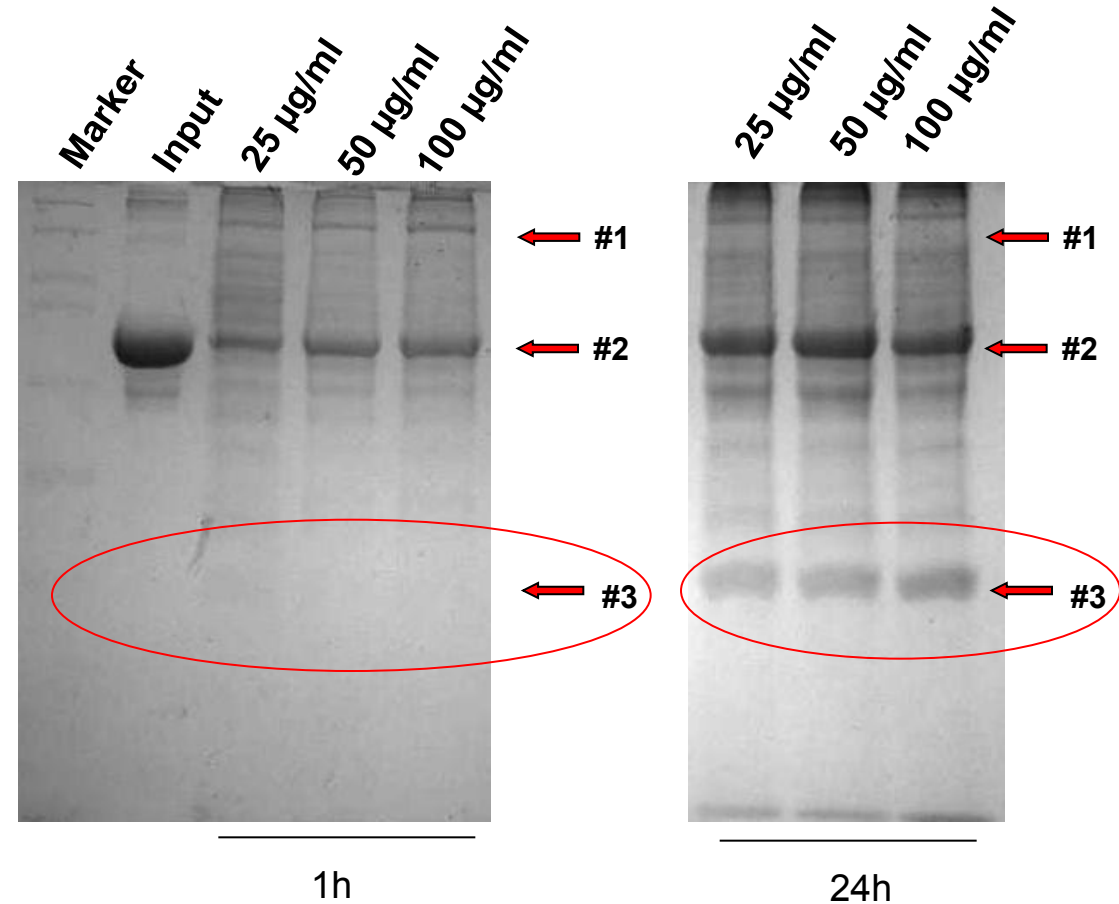
alle agglomeriert

(aber weniger stark als in Wasser)

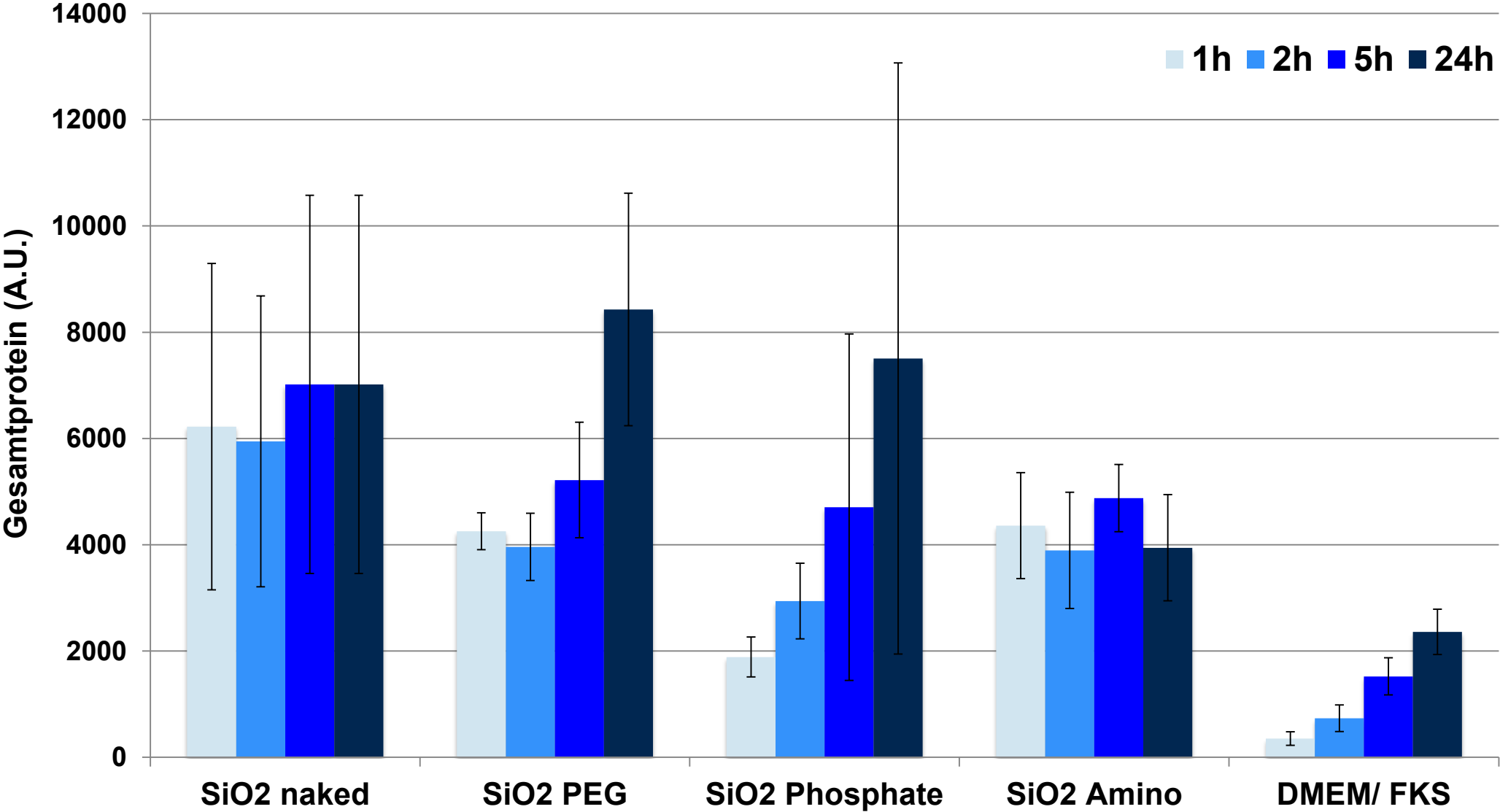
## SiO<sub>2</sub> naked

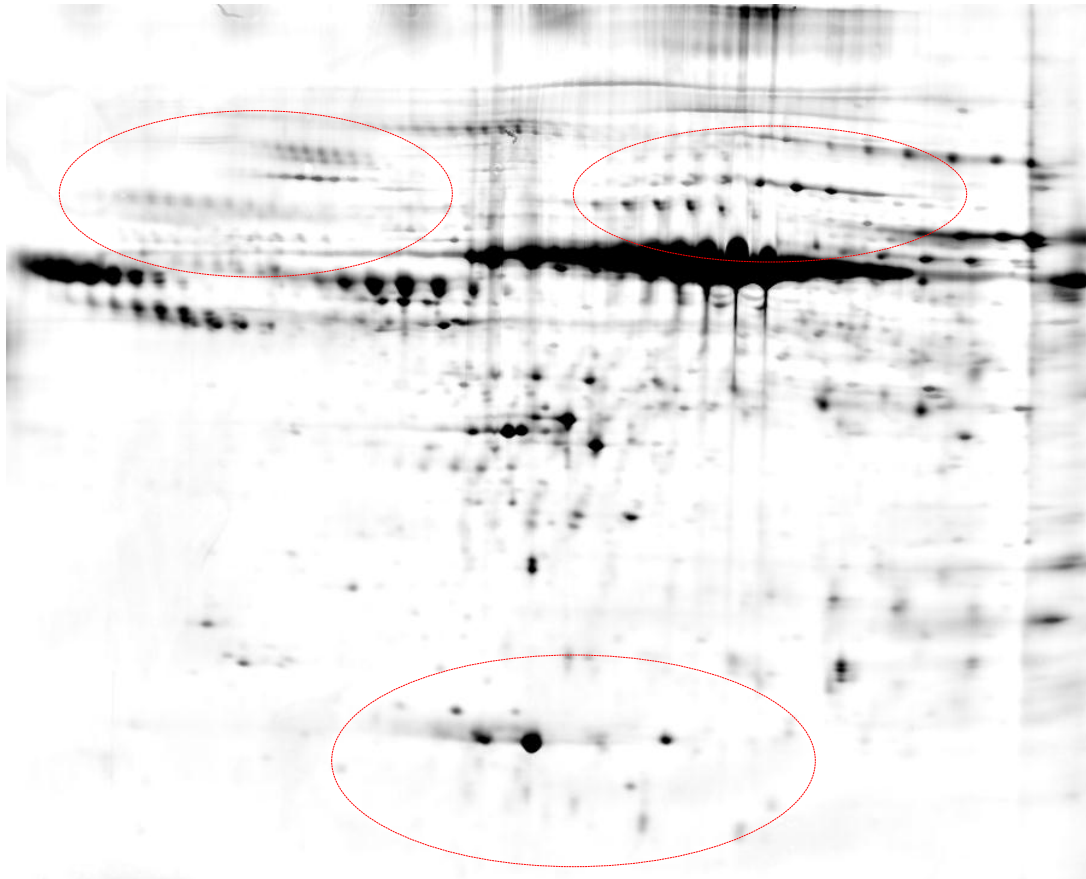


## SiO<sub>2</sub> PEG

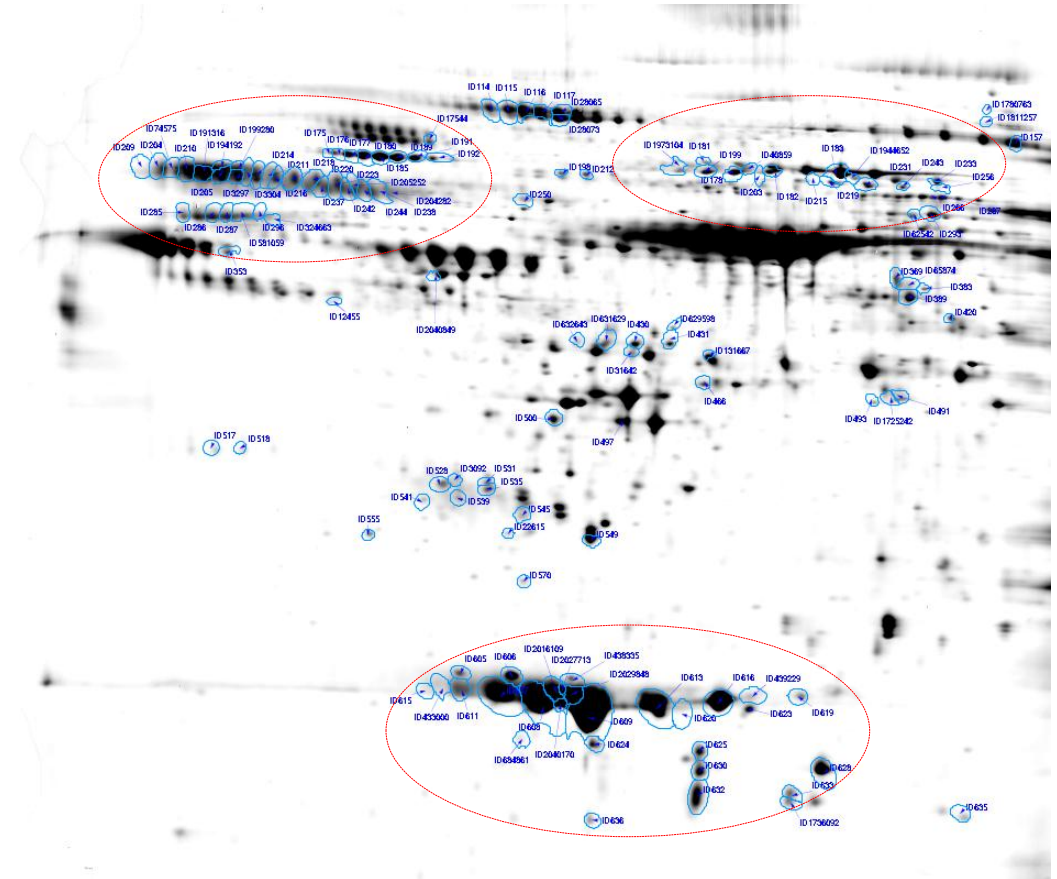


- verschiedene Serumproteine binden spezifisch an die Nanopartikeloberfläche
- verschiedene Nanopartikel zeigen Unterschiede im Bindungsverhalten der Proteine hinsichtlich der
  - Gesamtmenge an Protein
  - Identität der Proteine
  - Zeitverlauf der Bindung



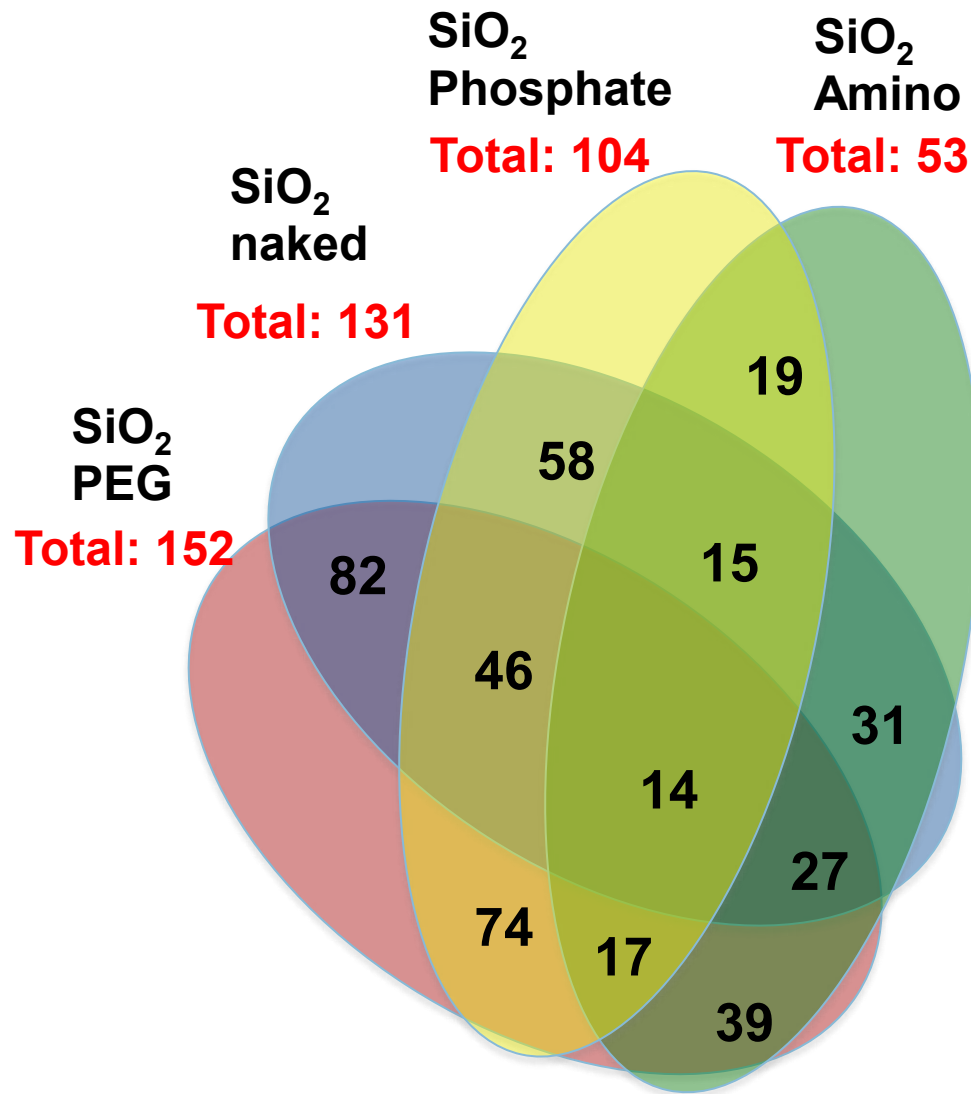


**Kontrolle DMEM/ FKS  
(keine NP)**

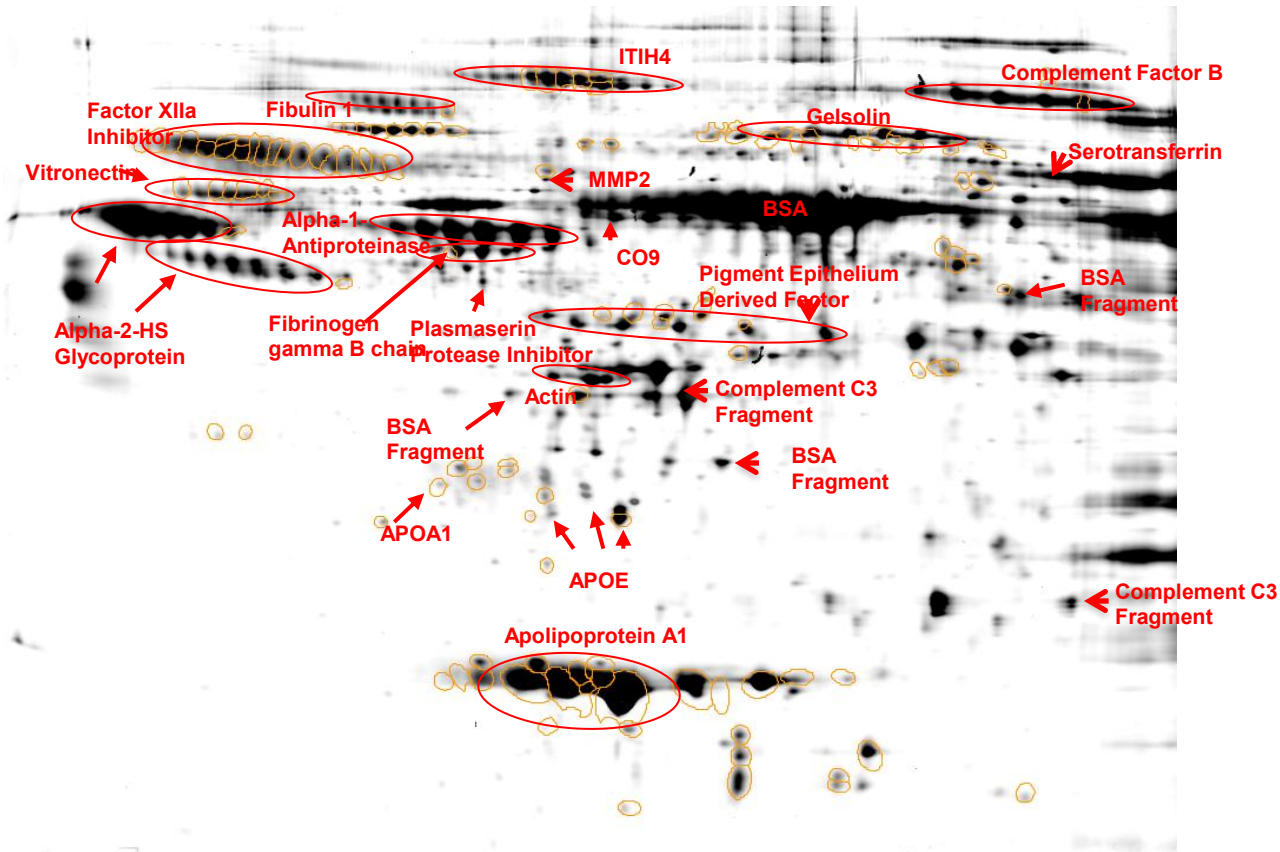


**SiO<sub>2</sub> naked (24h in DMEM +10% FCS)**

**131 Spots statistisch signifikant**  
(mind >1,5 fach höher als in Kontrolle,  $p < 0.05$ )  
(3 unabhängige Wiederholungen)







## Beispiele für spezifisch verstärkte Spots in der Proteincorona:

|                        | SiO <sub>2</sub> naked | SiO <sub>2</sub> PEG | SiO <sub>2</sub> Amino | SiO <sub>2</sub> Phosphate | Ag50 PVP | Ag50 Cit | Ag200 PVP | ZrO <sub>2</sub> Acryl | ZrO <sub>2</sub> PEG | ZrO <sub>2</sub> Amino | ZrO <sub>2</sub> TODS |
|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------------|----------|----------|-----------|------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| Vitronectin            | +                      | +                    | -                      | +                          | +        | -        | -         | -                      | -                    | -                      | -                     |
| Complement C3 Fragment | -                      | +                    | -                      | -                          | -        | -        | -         | -                      | -                    | -                      | -                     |
| Gelsolin               | +                      | +                    | -                      | +                          | -        | +        | -         | -                      | -                    | -                      | -                     |
| Alpha 1 Antitrypsin    | ?                      | ?                    | ?                      | -                          | +        | -        | -         | +                      | +                    | +                      | +                     |
| Apolipoprotein A1      | +                      | +                    | +                      | +                          | +        | -        | -         | -                      | -                    | ?                      | -                     |

**Die Oberflächenladung bestimmt im Wesentlichen die Interaktionsmuster von NM mit Proteinen und Lipiden (für 60 bis 80% der Beobachtungen)**

**1) SOP für Dispersion:** vorgestellt in OECD, getestet in großem Ringversuch (EU FP7 QualityNano)

**2) AUZ, DLS, NTA:** unterschiedliche Messwerte, jedoch dieselben Gruppen/ Trends

**3) Fast alle NM liegen in Wasser, PBS, Kulturmedium ohne Serum gut dispergiert vor**

Ausnahme: Pulvermaterialien  $\text{TiO}_2$  NM105 &  $\text{ZnO}$  NM110 (generell problematisch)

Ausnahme:  $\text{SiO}_2$  naked/ Amino,  $\text{ZrO}_2$  Acryl/ Amino agglomerieren über Inkubationszeit (in PBS/ Medium)

**4) In Medium mit Serum sind viele NM ähnlich dispergiert (agglomeriert) wie in Wasser**

Ausnahme: NM ohne sterische Stabilisierung aber mit neutral/positiver Ladung

**5) Alle NM interagieren mit Proteinen und bilden eine deutliche Proteincorona**

methodisch problematisch waren alle Silbermaterialien (Proteinelution unvollständig)

**6) Fast alle NM interagieren nur sehr schwach mit Lipiden**

bilden keine Strukturen, integrieren sich nur schwach und zumeist reversibel in Lipid-Vesikel.

**Ausnahmen mit stärkerer Wechselwirkung:  $\text{ZrO}_2$  Amino,  $\text{ZrO}_2$  PEG,  $\text{SiO}_2$  Amino**

**7) Generell verstärkt sich die Lipidinteraktion durch die Anwesenheit von Proteinen**

Surfaktant-Proteine fördern die Interaktion mit Lipiden, nicht aber vice versa.

# Herzlichen Dank an alle beteiligten Partner!

---

|      |  |
|------|--|
| BfR  | M. Driessen, D. Wittke, N. Dommershausen, A. Luch, A. Haase      |
| BASF | H. Platsch, B. von Vacano, W. Wohlleben                          |
| IBE  | A. Vennemann, M. Wiemann   |
| UdS  | C. Schulz, M. Hittinger, S. Räsch, U. Schäfer, C.M. Lehr         |
| BTS  | M. Voetz   |
| BIG  | D. Schippritt, T. Wagner, H.- G. Lipinski                        |
| WWU  | S. Cramer, R. Harishchandra, D. Wang, A. K. Sachan, H.- J. Galla |



UNIVERSITÄT  
DES  
SAARLANDES



Bayer Technology Services

**Fachhochschule  
Dortmund**  
University of Applied Sciences and Arts



WESTFÄLISCHE  
WILHELMS-UNIVERSITÄT  
MÜNSTER