



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

"Biologische Wirkungen ausgewählter Nanostrukturen in
Zellen des Gastrointestinaltrakts"

Verfasserin

Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
Joanna Pelka

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2010

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 091 419

Dissertationsgebiet lt. Studienblatt: Chemie

Betreuer / Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko

Für meine Familie

Prüfungskommission:

Prof. Dr. M. Cichna-Markl (Vorsitz)

Prof. Dr. D. Marko

Prof. Dr. W. Berger

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen März 2007 und Juni 2009 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie und wurde an der Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie im Dezember 2010 vollendet.

Ich danke Fr. Prof. Dr. D. Marko für die Überlassung des interessanten Themas sowie die wertvollen Hilfestellungen für das Gelingen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich den Gutachtern Fr. Prof. Dr. M. Cichna-Markl und Hr. Prof. Dr. W. Berger für die Übernahme der Beurteilung meiner Arbeit.

Arbeiter der Stirn

Ein Mensch sitzt kummervoll und stier
Vor einem weißen Blatt Papier.
Jedoch vergeblich ist das Sitzen –
Auch wiederholtes Bleistiftspitzen
Schärft statt des Geistes nur den Stift.
Selbst der Zigarre bittres Gift,
Kaffee gar, kannenvoll geschlürft,
Den Geist nicht aus den Tiefen schürft,
Darinnen er, gemein verbockt,
Höchst unzugänglich einsam hockt.
Dem Menschen kann es nicht gelingen,
Ihn auf das leere Blatt zu bringen.
Der Mensch erkennt, daß es nichts nützt,
Wenn er den Geist an sich besitzt,
Weil Geist uns ja erst Freude macht,
Sobald er zu Papier gebracht.

(Eugen Roth)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Begriffe und Definitionen im Bereich der Nanotechnologie	3
2.2 Vorkommen und Erscheinungsformen von Nanomaterialien mit Anwendungs- beispielen	5
2.2.1 Metalloxide	5
2.2.2 Halbleiter-Nanokristalle	6
2.2.3 Metalle	6
2.2.4 Kohlenstoffhaltige Nanostrukturen	7
2.2.5 Übersicht über Anwendungsbeispiele	8
2.3 Herstellungsverfahren von Nanomaterialien	10
2.3.1 Mechanisch-physikalische Herstellungsverfahren („Top-Down“)	10
2.3.2 Chemisch-physikalische Herstellungsverfahren („Bottom-Up“)	11
2.4 Nanospezifische Eigenschaften	12
2.5 Toxikologische Betrachtung von Nanomaterialien	14
2.5.1 Exposition des Menschen gegenüber nanostrukturierter Materie	14
2.5.2 Aufnahme nanostrukturierter Materie in den Körper	16
2.5.3 Zelluläre Aufnahme nanostrukturierter Materie	20
2.5.4 Biologische Wirkungen nanostrukturierter Materie	28
2.5.5 Wirkungsbestimmende Eigenschaften nanostrukturierter Materie	35

2.6	Zellulärer Redoxstatus	36
2.6.1	Generierung reaktiver Spezies	37
2.6.2	Antioxidative Mechanismen der Zelle	41
2.6.3	Der Nrf2/ARE-Signalweg	45
2.7	Erfassung des genotoxischen Potentials von Testsubstanzen	47
2.7.1	Das DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase	48
2.7.2	Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53	49
2.7.3	Induktion von Mikrokernen	51
2.8	Kohlenstoffnanoröhren (CNT)	54
2.8.1	Struktur und Eigenschaften	54
2.8.2	Herstellungs- und Aufreinigungsverfahren von CNTs	55
2.8.3	Anwendungsgebiete von CNTs	58
2.8.4	Toxikologische Betrachtung von CNTs	58
2.9	Platin (Pt)	62
2.9.1	Eigenschaften von Pt	62
2.9.2	Herstellung von Pt-NP mittels SFRD-Verfahren	63
2.9.3	Anwendungsgebiete von Pt bzw. Pt-NP	65
2.9.4	Toxikologische Betrachtung von Pt ⁰ , Pt ⁰ -NP und Pt-Verbindungen	65
3	Ziel der Arbeit	70
4	Ergebnisse und Diskussion	72
4.1	Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs)	72
4.1.1	Charakterisierung der untersuchten SWCNTs	72
4.1.2	Zelluläre Aufnahme von SWCNTs	75
4.1.3	Zytotoxische Eigenschaften von SWCNTs	76
4.1.4	Modulation des zellulären Redoxstatus durch SWCNTs	83
4.1.5	Genotoxisches Potential von SWCNTs	99
4.1.6	Zusammenfassung	119
4.2	Nanostrukturiertes Platin (Pt)	122
4.2.1	Charakterisierung der untersuchten Pt-Partikel	122
4.2.2	Zelluläre Aufnahme von Pt-Partikeln	128

4.2.3	Intestinaler Transport von Pt-Partikeln	133
4.2.4	Zytotoxische Eigenschaften von Pt-Partikeln	134
4.2.5	Modulation des zellulären Redoxstatus durch Pt-Partikel	139
4.2.6	Genotoxisches Potential von Pt-Partikeln	148
4.2.7	Zusammenfassung	161
4.3	Fazit	164
5	Material und Methoden	165
5.1	Materialienverzeichnis	165
5.2	Geräteverzeichnis	171
5.3	Raman-Spektroskopie	175
5.4	Rasterkraftmikroskopie	176
5.5	Bestimmung des Nickel- und Cobalt-Gehalts der einwandigen Kohlenstoff-nanoröhren (SWCNT)	176
5.6	Zellkultur	177
5.6.1	Zelllinien	177
5.6.2	Kultivierung von Monolayerkulturen	177
5.7	Zellinkubation	182
5.7.1	Zellinkubation mit SWCNTs	182
5.7.2	Zellinkubation mit Platin (Pt)	184
5.8	Untersuchung der zellulären Aufnahme mittels Elektronenmikroskopie	185
5.8.1	Reagenzien	186
5.8.2	Durchführung	187
5.9	Bestimmung der Protein-Konzentration	188
5.9.1	Proteinbestimmung nach Bradford	188
5.9.2	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	189
5.10	Untersuchung zytotoxischer Eigenschaften	191
5.10.1	Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblau-Ausschluss	191
5.10.2	Bestimmung des Zellwachstums mittels Sulforhodamin B (SRB)-Assay	192
5.10.3	Bestimmung der mitochondriellen Enzymaktivität mittels WST-1-Assay	194

5.10.4	Bestimmung der Membranintegrität mittels Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay	195
5.11	Untersuchungen zur Modulation des zellulären Redoxstatus	197
5.11.1	Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mittels 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF)-Assay	197
5.11.2	Bestimmung des intrazellulären Gesamt-Glutathion (tGSH)-Gehalts mittels GSH-Assay nach Tietze	200
5.11.3	Bestimmung der Nrf2-Translokation in den Zellkern mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (disk. SDS-PAGE) und Western Blot Analyse	205
5.11.4	Bestimmung der Bildung von Wasserstoffperoxid mittels Amplex [®] Red Hydrogen Peroxide Assay	213
5.12	Untersuchungen zum genotoxischen Potential	214
5.12.1	Bestimmung der DNA-strangbrechenden Wirkung mittels Einzelzellelektrophorese (Comet Assay)	215
5.12.2	Untersuchung zur Modulation der p53-Phosphorylierung mittels disk. SDS-PAGE und Western Blot Analyse	221
5.12.3	Untersuchung zur Induktion von Mikrokernen mittels Mikrokern-Test	223
5.12.4	Bestimmung der DNA-Platinierung	226
5.13	Bestimmung fragmentierter DNA mittels Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	229
5.13.1	Reagenzien	230
5.13.2	Durchführung	231
5.14	Untersuchung zum intestinalen Transport von Platin mit dem Caco-2 Millicell [®] -System	232
5.14.1	Reagenzien	233
5.14.2	Durchführung	233
Literaturverzeichnis		236
A Abstracts		283
A.1	Abstract Deutsch	283
A.2	Abstract Englisch	284
B Formeln		285

C Lebenslauf	287
D Publikationsliste	289
D.1 Veröffentlichungen	289
D.2 Posterbeiträge	290
E Dank	292

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AFM	atomic force microscopy
AP-1	activating protein-1
AP-Komplexe	Adapterproteinkomplexe
APS	Ammoniumperoxosulfat
ARF	alternative reading frame
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
β -CD	β -Cyclodextrin
BSA	bovine serum albumin
BSO	L-Buthionine-[S,R]-sulfoximin
CAD	caspase activated DNase
CB	carbon black
CCV	clathrin-coated vesicle
CDNP	combustion derived nanoparticles
CdS-ZnS QD	Cadmium- und Zinksulfid QD
CME	clathrin-mediated endocytosis
CNT	carbon nanotubes
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid

DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescin-Diacetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsb	double stand break
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	energy-dispersive X-ray analysis
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESR-Spektroskopie ..	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
EtBr	Ethidiumbromid
ETO	Etoposid
FKS	fetales Kälberserum
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPx	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	L-Glutathion, reduzierte Form
GSSG	L-Glutathion, oxidierte Form
GST	Glutathion-S-Transferasen
GTP	Guanosintriphosphat
Hb-EGF	Heparin-bindender EGF
HEPES	(2-[4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl]- ethansulfonsäure)

HRP	Horseradish Peroxidase
HRTEM	high resolution TEM
HU	Hydroxyurea
ICP-MS	Inductively-Coupled-Plasma Mass-Spectrometry
IL	Interleukin
INT	2-(4-Iodophenyl)3-(4- nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
KPK	Kernporenkomplex
LDH	Laktatdehydrogenase
LMA	low melting agarose
LumiGlo	Luminol-Lösung
LY	Lucifer Yellow
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MAPK	Mitogen aktivierbare Proteinkinase
MDC	Monodansylcadaverin
MEN	Menadion
MG	Molekulargewicht
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MWCNT	multi wall carbon nanotubes
NaC	Natriumcholat
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH/H ⁺	reduzierte Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NIR	Nahes Infrarot
NMA	normal melting agarose
NQO	4-Nitrochinolin-N-oxid

Nrf2	nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2) - related factor 2
OT	Objektträger
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PET	Polyethylenterephthalat
PGE	Platingruppenelemente
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIPES	(2-[4-(2-Sulfoethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure)
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PMEF	primary mouse embryo fibroblast
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	particle size distribution
PSE	Periodensystem der Elemente
Pt	Platin
QD	quantum dot
QSE	quantum size effect
RBrS	Reaktive Bromspezies
RCIS	Reaktive Chlorspezies
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFU	relative fluorescence units
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RS	Reaktive Spezies
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SCF	supercritical fluid
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	scanning electron microscopy
SRB	Sulforhodamin B
SSA	Sulfosalicylsäure
ssb	single strand break
SWCNT	single wall carbon nanotubes
tBHQ	tert-Butylhydrochinon
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoat
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
2-VP	2-Vinylpyridin
WST-1	water soluble tetrazolium
wt.%	Gewichtsprozent

Kapitel 1

Einleitung

"The role of the infinitely small in nature is infinitely large."

Dieses Zitat des französischen Naturwissenschaftlers Louis Pasteur (1822 - 1895) gilt nicht nur für die Biologie, sondern kann auch auf die als Schlüsseltechnologie der Zukunft bezeichnete Nanotechnik übertragen werden. Seitens der Politik, Wissenschaft und Wirtschaft werden in dieses Forschungsfeld große Erwartungen gelegt. Bereits gegenwärtig finden Nanomaterialien in verschiedenen Bereichen, darunter Chemie, Pharmazie, Medizin, Automobilindustrie, Bio- und Umwelttechnik sowie der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie, Anwendung. Insbesondere im Bereich der Biowissenschaften eröffnen sich neue Einsatzmöglichkeiten in der Applikation von Arzneimitteln, in Diagnostik und Therapie sowie in der Produktion von Biomaterialien mit einer höheren Sensitivität und Spezifität. Allein in Deutschland ist die Zahl der in der Nanotechnik aktiven Unternehmen im Jahr 2008 auf über 800 gestiegen. Dem Umweltbundesamt zufolge ist auf Grundlage der bestehenden Fachliteratur sowie der jährlich zunehmenden Zahl von Nanoprodukten davon auszugehen, dass Industrie und Gesellschaft auch in den kommenden Jahrzehnten maßgeblich durch diese Technologie beeinflusst werden.

Trotz der rasanten Entwicklung der Nanotechnologie in den vergangenen Jahren befindet sich die toxikologische Bewertung nanoskaliger Materialien im Anfangsstadium. So ist laut einer Stellungnahme des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) aus dem Jahr 2008 die Datenlage zur Bewertung von nanostrukturierter Materie, ebenso wie die Daten zur Expositionsabschätzung, für eine Risikobewertung zum Einsatz dieser Materialien derzeit noch unzureichend. Dies spiegelt sich darin wider, dass erst im Jahr 2004 unter dem Begriff der „Nanotoxikologie“ ein Forschungsfeld geschaffen wurde, welches sich mit der toxikologischen Relevanz der herausragenden Eigenschaften nanoskaliger Materie befasst [Monteiro-Riviere und Tran, 2007].

Auch seitens der Bundesregierung und der EU-Kommission wird durch die Förderung einer Reihe von Forschungsprojekten eine fundierte Datenlage hinsichtlich einer Risikobeurteilung von nanostrukturierter Materie angestrebt. Darunter sind beispielhaft das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Projekt „Innovations- und Technikanalyse zur Nano-

technologie“, die im Rahmen der „Nano-Care“-Initiative initiierten Projekte sowie die Aktionen „NanoSafe 1 und 2“ der Europäischen Union zu nennen.

Die bisherige Risikoforschung gibt aufgrund erster Hinweise auf ein gesundheitsschädliches Potential nanostrukturierter Materie Anlass zu weiterführenden Untersuchungen. Insbesondere im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge zwischen spezifischen Charakteristika einzelner Nanomaterialien und den daraus resultierenden biologischen Wirkungen besteht noch großer Forschungsbedarf. Des Weiteren beschränkt sich die bestehende Datenlage im Wesentlichen auf ein von einer Inhalation ausgehendes Gesundheitsrisiko, wohingegen andere Expositionswege, wie eine Aufnahme nanostrukturierter Materie über den Gastrointestinaltrakt, weitestgehend unberücksichtigt bleiben. Der stetig wachsende Einsatz nanostrukturierter Materie im Lebensmittelsektor in Form von Lebensmittel-Zusatzstoffen und Verpackungsadditiven [Knebel und Widmer, 2009] sowie die in der Literatur diskutierte Anreicherung dieser Materialien in der Nahrungskette durch ihren Eintrag in Wasser und Boden [Oberdörster et al., 2005c] machen Untersuchungen hinsichtlich eines von einer oralen Aufnahme ausgehenden Gefährdungspotentials jedoch notwendig. Zudem besteht die Möglichkeit, dass nanoskalige Partikel nach deren Aufnahme über den Respirationstrakt infolge des mukoziliären Abwehrmechanismus verschluckt werden [Kreyling et al., 2006], womit auch eine Inhalation zu einer Exposition des Gastrointestinaltrakts gegenüber nanostrukturierter Materie führen kann.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Begriffe und Definitionen im Bereich der Nanotechnologie

Im Folgenden soll der Begriff der „Nanotechnologie“ erläutert sowie ein Einblick in die Begriffsvielfalt der „Welt der kleinen Teilchen“ gegeben werden.

Nanotechnologie Im Grundsatz bezeichnet „Nanotechnologie“ (griech. *nānnos* = Zwerg) ein heterogenes Technologiefeld, welches sich mit Strukturen und Prozessen auf der Nanometerskala (ein Nanometer gleich ein Milliardstel Meter bzw. 10^{-9} m) befasst [Paschen et al., 2004]. Eine weiterführende und zugleich allgemein akzeptierte Definition dieses Begriffs existiert bislang jedoch nicht. Neben dem Aspekt der Größe sind weitere Gesichtspunkte für die Abgrenzung des Begriffs „Nanotechnologie“ wesentlich: Die im Nanometerbereich auftretenden veränderten Eigenschaften von Stoffen und Werkstoffen im Vergleich zu konventionellen Materialien gleicher chemischer Zusammensetzung aber makroskopischer Größenordnung sowie die zur gezielten Herstellung und/oder Manipulation einzelner Nanostrukturen eingesetzten Verfahren [Fiedeler et al., 2008].

Weiterhin erfordert die Nanotechnologie einen hohen Grad an interdisziplinärer Kooperation und Kommunikation. Gründe hierfür sind, dass einerseits auf der Nanoebene Begriffswelten verschiedener Fachrichtungen wie der Physik, Chemie und Biologie überlappen und andererseits, dass die Methoden einer einzelnen Disziplin durch Verfahren und Fachkenntnisse aus den anderen Fachrichtungen ergänzt werden können oder müssen [Paschen et al., 2004]. Aus den erläuterten Gründen ergibt sich die Schwierigkeit, sich auf eine einheitliche und präzise Definition zu einigen.

Vor dem Hintergrund der bestehenden Interdisziplinarität sowie des äußerst breiten Spektrums an Forschungsansätzen, Präparations-, Prozess- und Analysetechniken sowie der aufkommenden Produktvielfalt wächst allerdings der Bedarf an Regulierung und Standardisierung. Regulierungsmaßnahmen, vor allem für den Bereich der Toxikologie und der Risikoanalyse, bedürfen wiederum einer klaren Bezeichnung dessen, was „Nano“ ist bzw. umfasst. Aus diesem Grund nehmen die internationalen Bemühungen um eine Begriffsstandardisierung zunehmend Gestalt an.

Definitionen nach der Internationalen Organisation für Normung (ISO) Vor dem Hintergrund einer stetig wachsenden „Nanoindustrie“, welche die gezielte Synthese von Nanomaterialien verfolgt, beschäftigt sich seit dem Jahr 2005 das technische Komitee „Nanotechnologies“ ISO/TC229 der Internationalen Organisation für Normung (ISO) mit der Standardisierung von Terminologien und Definitionen auf dem Gebiet der Nanotechnologie. 2008 wurde als erstes Ergebnis die Technische Spezifikation ISO/TS 27687:2008 veröffentlicht, eine Vornorm, die bereits grundlegende Definitionen zu Nanoobjekten enthält. Abbildung 2.1 gibt eine Übersicht über wesentliche nanotechnologische Begriffe und ihre hierarchische Zuordnung sowie über die wichtigsten Definitionen im Bereich der Nanoobjekte nach der Vornorm ISO/TS 27687:2008. Dabei beschreibt der Begriff „nanoskalig“ Materie im Größenbereich von 1 nm bis 100 nm [ISO/TS 27687:2008].

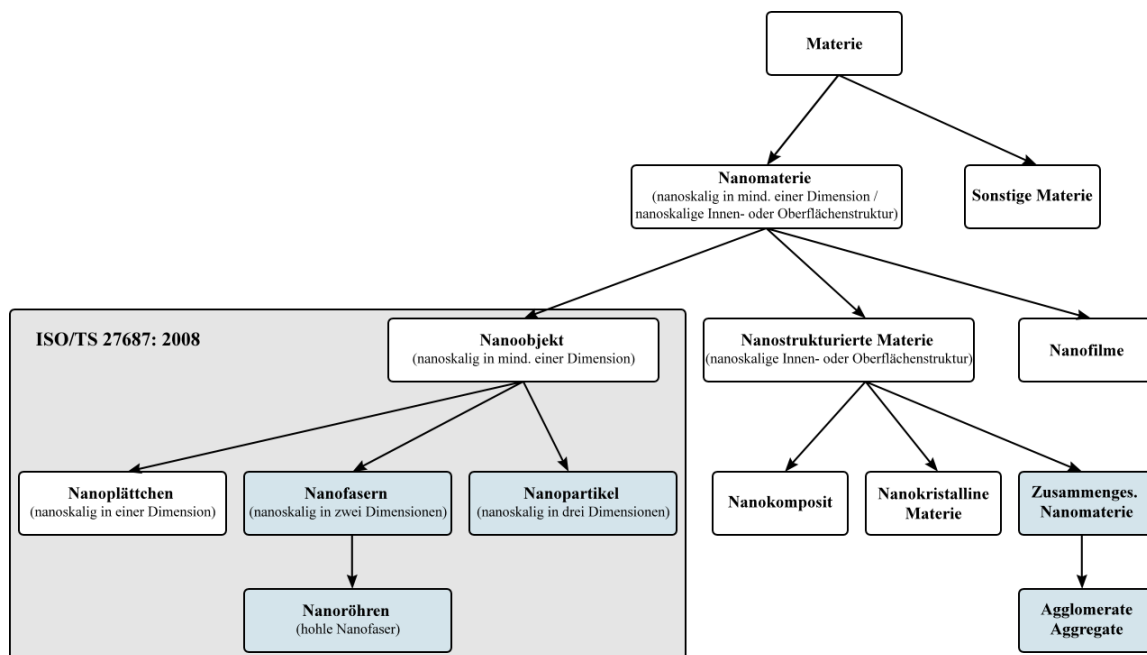


Abbildung 2.1: Übersicht über die Begriffsabgrenzungen im Bereich der Nanotechnologie (grau hinterlegt sind die bereits durch die ISO/TS 27687:2008 definierten Begriffe).

Zahlreiche weitere ISO-Normen für den Bereich der Nanotechnologie sind in Bearbeitung, darunter die ISO/TS 12901, welche Definitionen zu nanostrukturierten Materialien enthält sowie die ISO/TS 11751, in der Nanomaterialien aus Kohlenstoff definiert werden.

„Agglomerat“ und „Aggregat“ Weiterhin sollen in diesem Abschnitt die Begriffe Agglomerat und Aggregat voneinander abgegrenzt werden. „Agglomerate“ bzw. „Aggregate“ entstehen beim Zusammenschluss von Nanopartikeln (NP) zu größeren Verbundsystemen. Dabei bezeichnet der Begriff „Agglomerat“ eine Ansammlung von schwach miteinander verbundenen Partikeln [Som et al., 2010], Aggregaten oder einer Kombination derselben. Die Oberfläche der Agglomerate ist dabei in etwa vergleichbar mit der Summe der Oberflächen der einzelnen Teile. Unter dem Begriff „Aggregat“ sind hingegen stark aneinander gebundene Partikel zu verstehen. Dabei kann

die Oberfläche des Aggregats deutlich kleiner sein als die Summe der Oberflächen der einzelnen Bestandteile [Som et al., 2010].

Die am Zusammenschluss beteiligten NP werden als Primärpartikel bezeichnet, während Aggregat ebenso wie Agglomerate zu den Sekundärpartikeln zählen und der nanostrukturierten Materie zuzuordnen sind.

2.2 Vorkommen und Erscheinungsformen von Nanomaterialien mit Anwendungsbeispielen

NP können auf natürlichem Weg aber auch anthropogen, unbeabsichtigt oder beabsichtigt, erzeugt werden. Das natürliche Vorkommen von NP beruht weitestgehend auf Vulkaneruptionen und Waldbränden [Höpker et al., 2007]. Unbeabsichtigt freigesetzte NP entstehen durch Verbrennungsprozesse im Verkehr oder bei der Energieumwandlung, bei mechanischen Verschleißvorgängen sowie bei einer Vielzahl industrieller Prozesse. So werden bei der Verbrennung von Diesel in Motoren komplexe Gemische aus Ruß, Sulfaten, Schmierstoffen, unverbrannten Treibstoffresten und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 5 - 20 nm freigesetzt [Donaldson et al., 2005], während bei Schweißarbeiten aufgrund der hohen Temperaturen vorwiegend Metalloxide, u. a. von Metallen wie Aluminium, Cadmium oder Kupfer, entstehen.

Anzumerken bleibt, dass der unbeabsichtigte anthropogene Eintrag gegenwärtig mehr zur anthropogenen NP-Emission beiträgt als die industrielle NP-Produktion [Luther, 2004].

Bei den industriell und demnach beabsichtigt erzeugten und bereits im großtechnischen Maßstab im Einsatz befindlichen NP sind „carbon black“ (CB), auch Industrieruß genannt, Metalloxide wie Silizium-, Aluminium- oder Titandioxid, Metalle wie Gold und Silber sowie Halbleiter wie z.B. Galliumarsenid zu nennen. CB nimmt hierbei eine Sonderstellung ein, da es einerseits gezielt erzeugt wird und andererseits unbeabsichtigt durch industrielle Verbrennungsprozesse in die Umwelt gelangt.

In Forschung und Anwendung werden synthetische NP entsprechend ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften häufig in folgende Gruppen unterteilt: Metalloxide, Halbleiter, Metalle und kohlenstoffhaltige NP. Die einzelnen Erscheinungsformen werden im Folgenden näher beschrieben.

2.2.1 Metalloxide

Metalloxide auf der Nanoskala sind aufgrund ihrer mechanischen, optischen und elektrischen Eigenschaften sowohl für die Industrie als auch für die Wissenschaft von großer Bedeutung und finden im Bereich der Konsumgüter bereits breite Anwendung.

Zu den bekanntesten und systematisch charakterisierten Metalloxiden in nanostrukturierter Form gehören Titandioxid, Siliziumdioxid, Aluminiumoxid, Zinkoxid und Eisenoxid [Höpker et al.,

2007; Fernandez-Garcia und Rodriguez, 2007]. Anwendung finden diese anorganischen NP als UV-Schutz in Kosmetika und Textilien, als Photokatalysatoren mit antibakterieller Wirkung oder auch als Zusätze in Lebensmitteln und Lebensmittelbedarfsgegenständen.

Das meist eingesetzte Metalloxid ist nanoskaliges Titandioxid. Dieser Halbleiter zeichnet sich vor allem durch die effiziente Absorption und Streuung von UV-Licht aus und kommt daher in Sonnenschutzcremes oder Textilien zum Einsatz. Hierfür werden üblicherweise Partikel eines Durchmessers von 20 - 40 nm eingesetzt, da dies nach der Rayleigh-Streutheorie den optimalen Partikelgrößenbereich darstellt [Burniston et al., 2004; Wong et al., 2006]. Weiterhin findet es aufgrund seiner photokatalytischen Eigenschaften und der daraus resultierenden Generierung von Superoxid- und Hydroxylradikalen Verwendung als antibakterielle und geruchsmindernde Komponente [Park, 2007; Yang et al., 2003].

2.2.2 Halbleiter-Nanokristalle

Halbleiter-Nanokristalle („quantum dots“, QD) bewegen sich in einer Größenordnung von 1 - 10 nm. Die durch diesen geringen Partikeldurchmesser bedingte dreidimensionale räumliche Beschränkung der Ladungsträger (Elektronen und Löcher) führt zu signifikanten Veränderungen der elektronischen und optischen Eigenschaften. Die daraus resultierende Atom-ähnliche Diskretisierung der elektronischen Energieniveaus wird als Größenquantisierungseffekt („quantum size effect“, QSE) bezeichnet [Ness et al., 2003]. Die optischen Eigenschaften der QDs lassen sich nicht mehr mit dem Bändermodell beschreiben, sondern mit dem „Teilchen im Kasten“-Modell. Die Bandlücke eines Halbleiters, die für makroskopische Kristalle eine Stoffkonstante ist, hängt bei nanokristallinen Materialien nicht nur von der Materialzusammensetzung, sondern auch von der Partikelgröße ab. Je kleiner das Teilchen ist, desto größer wird die Bandlücke. Daraus ergeben sich bei Teilchen, die im sichtbaren Bereich Licht absorbieren verschiedene Farben für unterschiedliche Teilchengrößen aus einem Material [Ness et al., 2003; Wang et al., 2006].

Halbleiter-Nanokristalle ermöglichen durch einige spektroskopisch vorteilhafte Eigenschaften wie u.a. eine hohe Photostabilität, ein sehr breites Absorptionsspektrum, eine lange Fluoreszenzdauer und die im Vergleich zu typischen organischen Fluorophoren etwa halb so breiten Emissionsbanden die simultane Erfassung verschiedener Substanzklassen in Immunofluoreszenzassays. Über die chemische Zusammensetzung und die Größe können die spektralen Eigenschaften zudem gezielt verändert werden. Gebräuchliche Materialien für QDs sind CdSe, CdS, CdTe, InP und InAs [Goldman et al., 2006; Ness et al., 2003; Wang et al., 2006].

2.2.3 Metalle

Während halbleitende Nanokristalle aufgrund ihrer optischen Eigenschaften in der Labor- und medizinischen Diagnostik eingesetzt werden, finden rein metallische NP in erster Linie in der Katalyse Anwendung. So werden in modernen Abgaskatalysatoren bereits nanostrukturiertes Platin, Palladium und Rhodium zur Konvertierung von Verbrennungsschadstoffen eingesetzt.

Durch zunehmende Miniaturisierung und Kombination mit anderen Metallen bzw. Trägermaterialien soll die Effizienz dieser Platingruppenelemente (PGE) in der Abgaskatalyse zukünftig gesteigert werden [Cao, 2004].

Weitere Einsatzmöglichkeiten bestehen bei der Grundsanierung des Erdreichs. Ein innovatives Verfahren stellt hierbei die Injektion von nanoskaligem Eisen in den Untergrund mittels spezieller Injektionsanlagen dar. Nano-Eisen weist aufgrund seiner katalytischen Eigenschaften eine hohe Detoxifizierungsrate für chlorhaltige Pestizide auf [Bettmann et al., 2008].

Auch die bakterizide und fungizide Wirkung von Silber wird mittels Nanotechnologie zusätzlich verstärkt. Durch Zunahme der relativen Oberfläche der Silber-NP zeigt Nano-Silber gegenüber Proteinen eine erhöhte Reaktivität, wodurch beim Kontakt mit Bakterien oder Pilzen deren Metabolismus beeinflusst wird [Lee et al., 2003; Wong et al., 2006]. Darüber hinaus zerstören Silber-NP die Enzyme, die die Nährstoffe für die Zelle transportieren, destabilisieren die Zellmembran, das Zellplasma und stören die Zellteilung. So wird Nano-Silber in die Oberflächen von medizinischen Komponenten integriert und bietet mit weitaus breiterem Wirkungsgrad als dem von Antibiotika Schutz vor unerwünschten Mikroben [Wong et al., 2006]. Zudem führt die Nanotechnologie zur Entwicklung von Werkstoffen, die auf die Bedürfnisse des Kunden zugeschnitten sind. Die antibakteriellen Eigenschaften sind für viele Produkte, besonders in hygieneintensiven Bereichen der häuslichen Pflege, in der Lebensmittelproduktion, der Textilindustrie oder in der Kosmetik von Nutzen [Wong et al., 2006].

Als Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit wird auf metallisches Platin, Platin in nanostrukturierter Form und weitere Erscheinungsformen hinsichtlich Eigenschaften, Herstellungsverfahren, Anwendungsmöglichkeiten sowie bisheriger toxikologischer Datenlage in Abschnitt 2.9 näher eingegangen.

2.2.4 Kohlenstoffhaltige Nanostrukturen

Auf Kohlenstoff basierende Nanostrukturen können in unterschiedlichen Modifikationen vorkommen. Zu unterscheiden sind hier CB, Fullerene und Kohlenstoffnanoröhren.

Großtechnisch hergestellte Industrieruße werden unter kontrollierten Bedingungen hergestellt und sind von Schornsteinrußen/Dieselußen zu unterscheiden. Während erstere eine Stoffgruppe mit genau spezifizierten physikalischen, chemischen und anwendungstechnischen Eigenschaften darstellen, fallen letztere als nicht genau definierte Nebenprodukte bei der Verbrennung von Kohle bzw. Kohlenwasserstoffen an [Höpker et al., 2007]. Industrieruße bestehen aus annähernd kugelförmigen Primärteilchen mit einem Durchmesser von 5 - 500 nm, die sich zu verzweigten kettenförmigen Aggregaten zusammenlagern. Durch Variation der Herstellungsbedingungen können sowohl Durchmesser der Primärteilchen als auch deren Aggregation gezielt beeinflusst werden. Die technische Herstellung von Ruß basiert auf der unvollständigen Verbrennung und/oder thermischen Spaltung von Kohlenwasserstoffen. Ca. 93 % der Weltrußproduktion wird als Füllstoff für Elastomere verwendet, wobei der Hauptanteil als strukturverstärkende Materialkomponente in der Reifenindustrie Anwendung findet [Höpker et al., 2007].

Fullerene sind aus 12 pentagonalen und 20 hexagonalen Kohlenstoffringen aufgebaut und bilden eine kugelförmig geschlossene Struktur, welche aufgrund ihres aromatischen Charakters eine hohe Stabilität aufweist [Kumar, 2006]. Für das bekannteste, das „Buckminster-Fulleren“ (C_{60}) werden als Träger von Wirksubstanzen insbesondere medizinische Anwendungen erwartet, weiterhin findet es als Bestandteil von Solarzellen oder Schmierstoffen Einsatz und wird aufgrund seiner hohen Elektronenaffinität als Radikalfänger in „Anti-Aging-Cremes“ eingesetzt [Kumar, 2006].

Strukturell den Fullerenen verwandt sind die Kohlenstoffnanoröhren („carbon nanotubes“, CNT). Hierbei sind einwandige („single wall carbon nanotubes“, SWCNT) und mehrwandige („multi wall carbon nanotubes“, MWCNT) Nanoröhren zu unterscheiden. Im Vergleich zu den Fullerenen sind Kohlenstoffnanoröhren aus hexagonalen Kohlenstoffringen bestehende Zylinder, welche sowohl eine geschlossene als auch eine offene Struktur bilden können [Kumar, 2006].

Da CNTs Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sind, wird auf ihre Charakteristika, Herstellungsverfahren und Anwendungsmöglichkeiten sowie die bisherige toxikologische Datenlage in Abschnitt 2.8 im Detail eingegangen.

2.2.5 Übersicht über Anwendungsbeispiele

Wie aus diesem Abschnitt ersichtlich wird, ist das Spektrum der Anwendungsgebiete für NP sehr breit. Insbesondere für die Werkstoffentwicklung spielen NP eine wichtige Rolle, indem unter deren Zuhilfenahme Materialeigenschaften wie u.a. Leitfähigkeit, Gewicht, Stabilität, Flexibilität oder Temperaturbeständigkeit steuerbar werden. Eine Vielzahl von nanotechnologischen Produkten befindet sich bereits seit einiger Zeit auf dem Markt. Eine Übersicht über einige Anwendungsbeispiele von NP ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Darüber hinaus existieren bereits Konzepte zum Einsatz von NP in der regenerativen Medizin, zur Gewebezüchtung oder in hoch-effizienten Wasserstoffspeichern. Selbst der gezielte Wirkstofftransport von Medikamenten mithilfe nanostrukturierter Materie zur Behandlung von Krankheiten ist angedacht, was die hohen Erwartungen an die Nanotechnologie wiedergibt.

Tabelle 2.1: Übersicht über Nanomaterialien und ihre jeweiligen Anwendungsbereiche, modifiziert nach Höpker et al. [2007].

Nanomaterial	chem. Element / chem. Zusammensetzung	Zweck	Anwendungsbereich
Metalle	Silber (Ag)	antibakterielle Wirkung	Kosmetik, Textilien, pharmazeutische Produkte
	Eisen (Fe)	Reduktionsmittel	Wasseraufbereitung
	Platin (Pt), Palladium (Pd)	Katalyse	Katalysatoren
	Siliziumdioxid (SiO ₂)	Verbesserung der Rieselfähigkeit, Verringerung der Haftfähigkeit	Lebensmittel
Metalloxide		Oberflächenversiegelung	Reinigungsmittel
		Wirkstofftransport	Pharmazie und Medizin
	Titandioxid (TiO ₂)	UV-Schutz, Sauerstoffeintrittsminderung, Feuchtigkeitsverlust	Lebensmittelverpackungen
		UV- und Korrosionsschutz, Kratzfestigkeit	Farben
		UV-Schutz	Kosmetik
	Aluminiumoxid (Al ₂ O ₃)	Stabilisator	Kosmetik
		Oberflächenversiegelung	Reinigungsmittel
	Zinkoxid (ZnO ₂)	UV-Schutz, Oberflächenveredelung	Kosmetik, Additiv zu kratzfesten Oberflächen
	Zirkoniumdioxid (ZrO ₂)	Erkennung und Behandlung von Tumoren	Medizin
	Quantum Dots typischerweise aus einem metalliden Kern bestehen aus Cadmiumselenia (CdSe), Indiumarsenid (InAs), Zinksulfid ZnS		
Halbleiterkristalle		Markierung und Visualisierung von Vorgängen auf zellulärer und subzellulärer Ebene	Miniaturisierte Lichtquellen
		Lichtemittierende Dioden (LED)	Flachbildschirme, Datenspeicher
	Industrieruß („carbon black“)		Automobilindustrie, Drucker, Trägermaterial für Katalysatoren
	Fullerene (z.B. C ₆₀ -Fulleren)	Antioxidans, Radikalfänger	Kosmetik, Pharmazie, Datenspeicher
Kohlenstoffnanoröhren		mechanische Festigkeit, Leitfähigkeit	Transistoren, Datenspeicher, Bildschirme
		Wirkstofftransport	Medizin

2.3 Herstellungsverfahren von Nanomaterialien

Nanostrukturierte Materialien wie z.B. Industrieruß werden bereits seit mehreren Jahrzehnten hergestellt. Dennoch wächst mit der Anwendungsvielfalt der Herstellungsbedarf und durch die neuen und verbesserten Technologien auch das Herstellungspotenzial. Unter den großtechnisch gefertigten Nanomaterialien treten NP mit einem Anteil von 80 % deutlich hervor [Raab et al., 2008].

Je nach Einsatzgebiet der NP ist eine genau definierte und enge Partikelgrößenverteilung (Monodispersität) wesentlich. Partikeleigenschaften wie Durchmesser, Kristallinität, Form sowie Aggregations- bzw. Agglomerationsgrad können über Herstellungs- und Reaktionsparameter wie Temperatur, pH-Wert, Konzentration, chemische Zusammensetzung, Oberflächenmodifikation und Prozessführung gesteuert werden [Raab et al., 2008].

Zur Herstellung von NP werden grundsätzlich zwei verschiedene Strategien verfolgt: „Top - Down“ und „Bottom - Up“. Während unter „Top - Down“ (von oben nach unten, vom Großen ins Kleine) die mechanische Zerkleinerung größerer Vorstufen zu verstehen ist, werden in der „Bottom - Up“-Methode (von unten nach oben, vom Kleinen ins Große) Strukturen aus kleineren Vorstufen mittels chemischer Prozesse aufgebaut (siehe Abb. 2.2). Im Folgenden werden beide Strategien

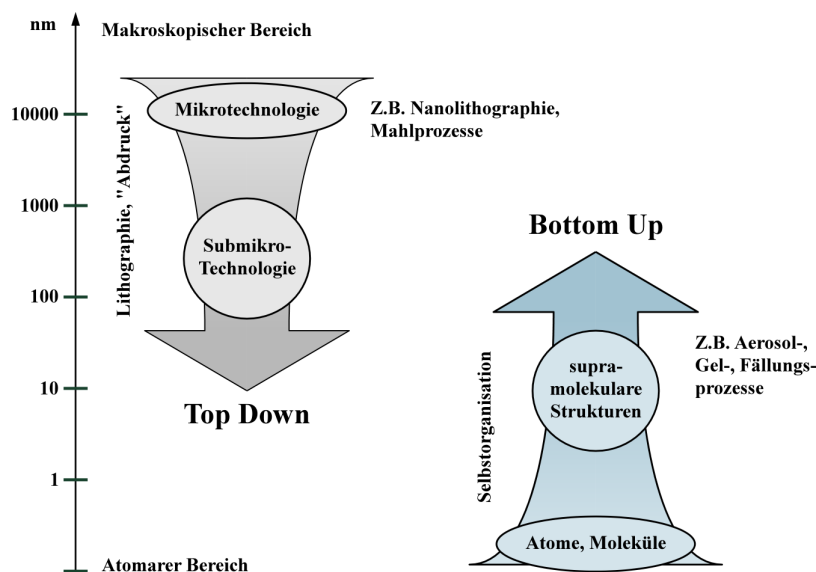


Abbildung 2.2: Überblick über Methoden zur Herstellung nanostrukturierter Materie, modifiziert nach Raab et al. [2008].

mit den jeweils darunter einzuordnenden Herstellungsverfahren näher beschrieben.

2.3.1 Mechanisch-physikalische Herstellungsverfahren („Top-Down“)

Mechanisch-physikalische Herstellungsverfahren werden vorwiegend in Bereichen der Physik und physikalischen Technik angewandt und beruhen auf Ansätzen der Mikrosystemtechnik [Raab et al., 2008]. Die Zerkleinerung des Ursprungmaterials erfolgt hierbei entweder durch Mahlprozesse

oder lithografische Methoden [Rubahn, 2004]. *Mahlverfahren* kommen bei der Herstellung metallischer und keramischer Nanomaterialien zum Einsatz. Hierbei werden herkömmliche Ausgangsstoffe mithilfe von Hochenergie-Kugelmøhlen pulverisiert. Die dabei aufkommende thermische Belastung der Mahlkörper kann zu deren Abrieb und damit zur Verunreinigung der mit dieser Methode gefertigten NP führen. Weiterhin ist dieser Weg der Partikelherstellung mit Produktpulvern breiter Partikelgrößenverteilung und geringfügig kontrollierbarer Partikelform verbunden [Raab et al., 2008].

Die *Lithografie* (aus dem Griechischen: lithos, „Stein“ und graphein, „schreiben“ [Menge, 1967]) stellt eine weit verbreitete Methode zur Nanostrukturierung dar. Darunter sind Verfahren zu verstehen, bei denen zunächst Strukturen in einem lokal veränderbaren Material erzeugt und nachfolgend in ein anderes, beliebiges Objekt übertragen werden. Dabei wird die lokale Veränderung neben mechanischer Einwirkung weitestgehend unter Anwendung kontrollierbarer, fokussierter Strahlung herbeigeführt (Photolithografie). Durch dieses abbildende Verfahren können unter Einwirkung von Photonen-, Elektronen- oder Ionenstrahlung Kopien beliebiger Nanostrukturen in Festkörperoberflächen „eingeschrieben“ werden [Hinze, 1998; Rubahn, 2004].

2.3.2 Chemisch-physikalische Herstellungsverfahren („Bottom-Up“)

Chemisch-physikalische Herstellungsverfahren nutzen die Grundsätze der molekularen bzw. atomaren Selbstorganisation und finden überwiegend in der Chemie und Biologie Anwendung. Durch den gezielten Aufbau komplexer Strukturen aus Atomen oder Molekülen ermöglichen diese Verfahren Kontrolle über Partikelgröße und Form. Unter die chemisch-physikalischen Herstellungsverfahren fallen Gasphasenprozesse und Flüssigphasenprozesse [Rubahn, 2004].

Unter Einsatz von *Gasphasenprozessen* werden Nanomaterialien in Pulver- oder Filmform im großtechnischen Maßstab hergestellt. Die NP werden durch Verdampfen des Ausgangsmaterials aus der Gasphase gebildet. Das Verdampfen bzw. thermische Zersetzen der Ausgangsmoleküle wird dabei unter Einsatz von thermischer (1.200 - 2.200 °C), Plasma- oder Laser-Energie durchgeführt. Die Partikelbildung erfolgt mithilfe homogener Keimbildung und das nachfolgende Partikelwachstum unter Anwendung von Kondensations-, Koagulations¹- und Koaleszenz²-vorgängen sowie durch chemische Reaktionen an der Partikeloberfläche [Raab et al., 2008; Rubahn, 2004]. Die Gasphasensynthese wird vorwiegend bei der Herstellung von Fullerenen und Kohlenstoffnanoröhren verwendet [Raab et al., 2008].

Flüssigphasenprozesse laufen im Vergleich zur Gasphasensynthese in der Regel bei niedrigeren Temperaturen ab. Hierbei sind insbesondere Sol-Gel-Prozesse und Fällungen zu nennen.

Sol-Gel-Synthesen bezeichnen die mehrstufige Herstellung nichtmetallischer, anorganischer oder hybridpolymerer Materialien aus kolloidalen Dispersionen, den sog. Solen. Die Größe der dabei gebildeten Solpartikel liegt im Nanometerbereich, wodurch dieser Prozess u.a. bei der Erzeugung

¹ Aneinanderhaftung zweier oder mehrerer Partikel [Raab et al., 2008]

² Partikelfusion [Raab et al., 2008]

oxidischer NP oder poröser Nanomaterialien Anwendung findet [Aegerter et al., 2008; Raab et al., 2008]

Fällungsprozesse kommen bei der Herstellung metallischer, metalloxidischer und nicht-oxidischer NP zum Einsatz. Diese Prozesse basieren auf Reaktionen in Lösungsmitteln gelöster Ausgangssalze nach Zugabe entsprechender Fällungsreagenzien in Abhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeit und -bedingungen (Konzentration des Ausgangsmaterials, Temperatur, pH-Wert). Unter Variation der Parameter lassen sich Partikel mit definierter Partikelgröße und -größenverteilung sowie Kristallinität und Morphologie herstellen [Raab, 2008].

Ein weiteres nasschemisches Verfahren stellt das SFRD („supercritical fluid reactive deposition”)-Verfahren dar, welches die Eigenschaften überkritischer Fluide („supercritical fluid”, SCF) nutzt und zur Synthese metallischer NP herangezogen wird [Zhang und Erkey, 2006].

Auf die Gasphasensynthese und das SFRD-Verfahren wird im Zusammenhang mit der Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten Nanomaterialien in den Abschnitten 2.9 und 2.8 näher eingegangen.

2.4 Nanospezifische Eigenschaften

Nanomaterialien sind insbesondere aufgrund ihrer veränderten Eigenschaften im Vergleich zum großkörnigem Pendant von großem Interesse. Während Materie gleicher chemischer Zusammensetzung im Mikrometerbereich unabhängig von ihrer tatsächlichen Größe vergleichbare physikalische Eigenschaften aufweist, treten mit Verkleinerung des entsprechenden Materials in den Nanometerbereich in Abhängigkeit von der Größe neue Eigenschaften auf. Ebenso unterscheiden sich die Eigenschaften gegenüber jenem Material in atomarer oder molekularer Form. Somit nehmen Nanomaterialien einen Übergangszustand zwischen atomarer/molekularer und grobstrukturierter Materie ein [Schmid, 2004].

Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung liegt in der Tatsache, dass die Oberfläche im Verhältnis zum Volumen mit abnehmendem Partikeldurchmesser exponentiell größer wird. Folglich nimmt auch der Anteil der Oberflächenatome zu (siehe Abb. 2.3) [Kreyling et al., 2006]. NP

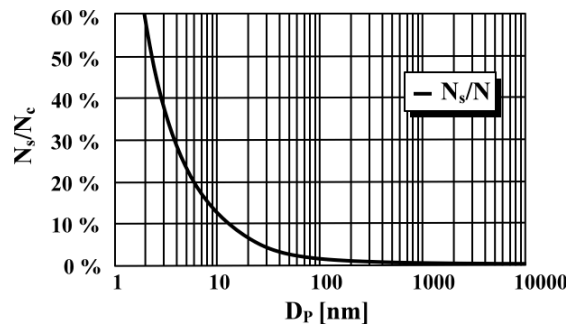


Abbildung 2.3: Prozentualer Anteil an Oberflächenatomen (N_s/N) in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser (D_p), modifiziert nach Kreyling et al. [2006].

von 10 nm Durchmesser haben 20 % der ca. 30.000 Atome des gesamten Partikels an dessen Oberfläche, Partikel mit einem Durchmesser von 2 nm bereits 80 % [Raab et al., 2008].

Da Oberflächenatome nur zum Partikelinneren hin mit gleichartigen Nachbarn umgeben sind, haben sie eine höhere Energie als partikelinterne Atome. Mit abnehmendem Partikeldurchmesser und höherem Anteil an Oberflächenatomen steigt demnach der Anteil der Oberflächenenergie an der Gesamtenergie. Darüber hinaus haben die Atome an der Oberfläche einen höheren Anteil sog. nicht abgesättigter Koordinationsstellen, was zu einer erhöhten Reaktivität der Partikeloberfläche führt [Raab, 2008; Zhang und Erkey, 2006]. Als Folge der erhöhten Reaktivität werden die Eigenschaften der NP vor allem von den Atomen an ihrer Oberfläche bestimmt, und nicht mehr vom Teilcheninneren wie beim ausgedehnten Festkörper [Niederberger, 2004; Raab et al., 2008].

In der erhöhten Reaktivität liegt auch das Aggregations- bzw. Agglomerationsverhalten von in Gasen oder Flüssigkeiten suspendierten NP begründet. Das Ausmaß ist von der Partikelkonzentration, der Zusammensetzung, der chemischen Beschaffenheit der Partikeloberfläche und dem Suspensionsmedium abhängig [Borm et al., 2006].

Neben der erhöhten Reaktivität können auch optische Eigenschaften der NP wie Absorption, Lumineszenz und Streuung durch Variation des Partikeldurchmessers gesteuert werden, wie es für das Beispiel der Halbleiternanokristalle in Abschnitt 2.2 bereits erläutert wurde. Die größenabhängigen optischen Eigenschaften werden in Abb. 2.4 beispielhaft an Cadmium- und Zinksulfid QD (CdS-ZnS QD) veranschaulicht. Zu sehen ist, dass mit Abnahme des Partikeldurchmessers kürzere Wellenlängen absorbiert bzw. Lichtquanten höherer Energie emittiert werden (sog. Blauverschiebung) [Goldman et al., 2006].

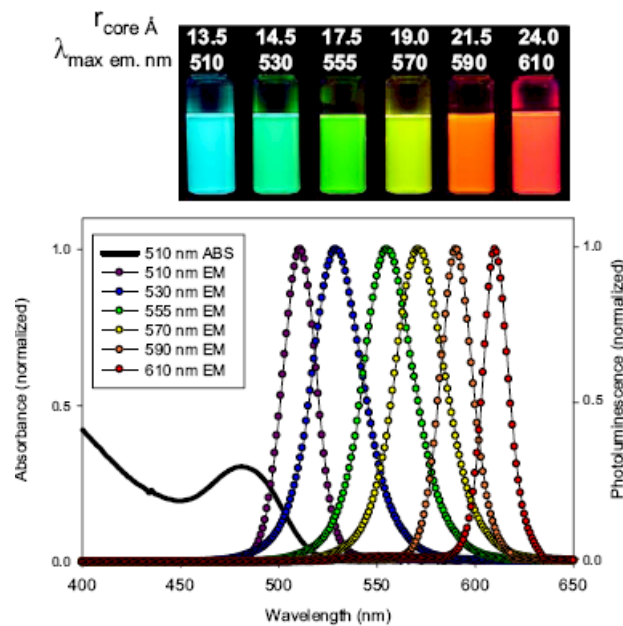


Abbildung 2.4: Lichtemission von CdS-ZnS QD in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser [Goldman et al., 2006].

Neben veränderten elektronischen und optoelektronischen Eigenschaften zeigen Nanomaterialien im Vergleich zu makroskopischen Strukturen zudem ein anderes mechanisches, magnetisches und thermodynamisches Verhalten [Shall et al., 1996; Colvin et al., 1994; Gryaznov und Trusov, 1993; Kruis et al., 1998; Goldstein et al., 1992]. Da diese Eigenschaften für die Fragestellung dieser Arbeit unwesentlich sind, wird nicht näher darauf eingegangen.

2.5 Toxikologische Betrachtung von Nanomaterialien

Durch das für nanoskalige Materialien veränderte Verhältnis von Oberflächen- zu Volumenatomen (siehe Abschnitt 2.4) resultiert eine sog. „größeninduzierte Funktionalität“ [Müller et al., 2008], die zu einer veränderten biologischen Aktivität dieser Stoffe führen kann. Hiermit ergeben sich neue Fragestellungen hinsichtlich eventuell vorhandener Risiken für die menschliche Gesundheit und die Umwelt.

In naher Zukunft ist sehr wahrscheinlich mit einer erheblichen Steigerung der Produktion von Nanomaterialien und damit verbunden auch mit ihrer möglichen Freisetzung in Luft, Wasser und Boden zu rechnen, woraus eine erhöhte Exposition des Menschen resultieren kann. Daraus hat sich als neues Arbeitsgebiet die Nanotoxikologie entwickelt, deren Ziel es ist, die Risiken nanoskaliger Strukturen zu beurteilen bzw. abzuschätzen [Oberdörster et al., 2005a]. Dabei sind insbesondere wirkungsbestimmende Eigenschaften wie Durchmesser, Masse oder Oberfläche, die bisher bei toxikologischen Untersuchungen keine Rolle gespielt haben, zu berücksichtigen. Ebenso der Kinetik nanostrukturierter Materialien nach ihrer Aufnahme in den Körper, also deren Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung, ist im Hinblick auf den Einsatz realistischer NP-Dosen in toxikologischen Studien eine tragende Rolle zuzuweisen.

Im Folgenden soll der aktuelle Wissensstand zur toxikologischen Beurteilung nanostrukturierter Materie dargestellt werden. Dabei werden wichtige Teilaspekte wie die mögliche Exposition des Menschen, die Aufnahme und Verteilung im Körper, zelluläre Aufnahmemechanismen sowie mögliche Wirkungen auf die Zelle betrachtet. Daneben wird kurz auf die Kinetik von Nanomaterialien und deren wirkungsbestimmende Eigenschaften eingegangen.

2.5.1 Exposition des Menschen gegenüber nanostrukturierter Materie

Abhängig von Produktion und Gebrauch können Nanomaterialien die Umweltmedien Luft oder Wasser erreichen, um letztlich in den Boden oder das Grundwasser zu gelangen. Darüber hinaus kann die Exposition gegenüber Nanomaterialien über Produkte und Lebensmittel erfolgen. Diese für den Menschen möglichen Expositionspfade werden nachfolgend dargestellt.

2.5.1.1 Exposition über die Luft

Der Mensch ist seit langem Ultrafeinstaub in der Umgebungsluft ausgesetzt. Bei Naturkatastrophen wie z.B. Vulkanausbrüchen oder Waldbränden, durch Kraftfahrzeug- und Industrieabgase

sowie bei der Herstellung und Verwendung von synthetischen Nanomaterialien wird nanostrukturierte Materie in die Atmosphäre freigesetzt, wodurch die inhalative Exposition für ein mögliches Gesundheitsrisiko des Menschen von vorrangiger Bedeutung ist. So wird ein direkter Zusammenhang zwischen alveolargängiger Feinstaubbelastung und steigender Inzidenz an Asthma, Lungenkrebs und Herz-Kreislauferkrankungen gesehen [Weichenthal et al., 2007]. Weiterhin wurde in epidemiologischen Studien der Beitrag nanoskaliger Verbrennungsrückstände („combustion derived nanoparticles“, CDNP) zu diesen Erkrankungen nachgewiesen [Donaldson et al., 2005; Ibal-Mulli et al., 2002]. Ausreichende Daten, die eine fundierte Expositionsabschätzung, insbesondere im Hinblick auf Dauer und Höhe erlauben, liegen allerdings bislang weder für ultrafeine Staubpartikel noch für synthetische Nanomaterialien vor.

Der Mangel an verlässlichen Daten über die Konzentration und Erscheinungsform von nanostrukturierter Materie in der Luft ist im Wesentlichen dem Fehlen standardisierter Messverfahren zuzuschreiben. Die Entwicklung derartiger Messverfahren gestaltet sich jedoch aufgrund vielfältiger Faktoren sehr komplex. Da sich NP in der Luft Gasmolekülen ähnlich verhalten und so gut wie nicht sedimentieren, können sie große Distanzen zurücklegen. Aufgrund der hohen Diffusionskoeffizienten mischen sie sich zudem schnell in Aerosolsysteme, was besonders sensitive Detektionssysteme erforderlich macht [Krug et al., 2007]. Weiterhin müssen bei solchen Untersuchungen die diffusionsbedingte Neigung zur Aggregation und Agglomeration und das damit einhergehende Partikelwachstum berücksichtigt werden. Eine zusätzliche Schwierigkeit besteht darin, dass luftgetragene Partikel keine einheitliche Population, sondern Gemische unterschiedlicher Quellen darstellen, so dass deren Bestimmung und eindeutige Quellenzuweisung häufig erschwert werden [Krug et al., 2007].

Zudem stellt nicht nur die Erfassung ultrafeiner Teilchen in der Luft am Arbeitsplatz und in der Umwelt ein Problem dar, ebenso die Exposition in toxikologischen Wirkungsuntersuchungen gestaltet sich schwierig. Dennoch existieren bereits verschiedene Forschungsansätze, die eine realitätsnahe Exposition gegenüber luftgetragenen Partikeln zu simulieren versuchen. Als Beispiel kann hier ein in Baden-Württemberg (Deutschland) angesiedeltes Forschungsprojekt herausgegriffen werden. So wurde im Karlsruher Institut für Technologie (KIT) eine Expositionsapparatur entwickelt, welche die Exposition von Zellkulturen gegenüber einer partikelbeladenen Testatmosphäre erlaubt [Krug et al., 2007; Paur et al., 2008]. Durch das Temperieren und Anfeuchten der Testatmosphäre gemäß den Bedingungen in der menschlichen Lunge, kann eine inhalative Exposition des Menschen durch Verbrennungsabgase oder andere Partikelemissionen in Toxizitätstests realitätsnah nachgestellt werden.

2.5.1.2 Exposition über Wasser und Boden

Durch den Einsatz von NP in Sonnenschutzcremes (TiO_2 -NP), Haarwaschmitteln (Al-NP) oder bei der Grundwassersanierung (metallische als auch Polymer-NP) [Daughton und Ternes, 1999; Wang und Zhang, 1997] werden auch das Grundwasser und der Boden als mögliche Belastungsquellen zunehmend relevanter und sollten bei Abschätzungen eines Gesundheitsrisikos beachtet

werden. Jedoch gestaltet sich auch hier eine Expositionsabschätzung aus folgenden Gründen schwierig: Zum Einen weisen NP abhängig von der jeweiligen Stoffklasse unterschiedliche Beweglichkeit in porösen Medien auf, zum Anderen können sie während ihres Transports im Wasser oder durch die Bodenmatrix mit anderen Chemikalien bzw. Schadstoffen reagieren oder diese adsorbieren und damit trotz grundsätzlicher Unbedenklichkeit zu einer Gefährdung beitragen [Gerde et al., 2001]. Am Beispiel der Fullerene konnte zudem gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit und die Mobilität von NP in Wasser und Boden sehr stark mit den physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche dieser Teilchen variiert und sich die Transporteigenschaften im Aquifer in Abhängigkeit von Ionenstärke und pH-Wert unterscheiden. Insbesondere die Form der Fullerene erwies sich als die am wenigsten mobile in Boden- und Wasseruntersuchungen und ließ dieses Nanomaterial in seinem Transportverhalten von gängigen Modellen für den Partikeltransport abweichen [Oberdörster, 2004]. Oberdörster et al. [2004] konnten zudem eine systemische Wirkung von in Wasser suspendierten Fullerenen auf Fische zeigen, welche nach Exposition gegenüber „Buckyballs“ (C_{60} -Fulleren) eine erhöhte Lipidperoxidation sowie Veränderungen der Genexpression in der Leber aufwiesen. Diese Studie wirft die Frage nach einer möglichen Akkumulation nanostrukturierter und weitestgehend schlecht biodegradierbarer Materie in der Nahrungskette auf [Krug et al., 2005].

2.5.1.3 Exposition über Lebensmittel und sonstige Verbraucherprodukte

Neben der Möglichkeit einer Akkumulation von Nanomaterialien in der Nahrungskette durch ihren Eintrag in Wasser und Boden, kann der Mensch NP direkt durch ihren gezielten Einsatz in Nahrungsmitteln aufnehmen. Allerdings existieren bisher weltweit keinerlei verbindliche Sicherheitsstandards und -tests für deren Verwendung im Lebensmittelbereich [BUND, 2008]. Obwohl, nach Angaben der Lebensmittelbranche, der derzeitige Einsatz von nanostrukturierten Zusatzstoffen in Deutschland keine Bedeutung hat, wird nanoskaligen Lebensmittel-Zusatzstoffen und Verpackungsadditiven für die Zukunft eine wichtige Rolle prognostiziert [Knebel und Widmer, 2009]. Ähnlich verhält es sich mit dem Einsatz von NP in Verbraucherprodukten. Auch hier kann derzeit, bedingt durch das Fehlen geeigneter Messverfahren, keine quantitative Expositionsabschätzung vorgenommen werden. Im Rahmen einer vorläufigen Gewichtung der Exposition durch Verbraucherprodukte sollen in Abhängigkeit der Marktverbreitung insbesondere „Nanoprodukte“ wie z.B. Sonnenschutzmittel, Klebstoffe sowie Pflege- und Reinigungsprodukte in zukünftigen Expositionsstudien betrachtet werden. Lediglich im Bereich der Kosmetik hat das Europäische Parlament eine neue Kosmetikverordnung verabschiedet, die erstmals Regelungen zum Einsatz von Nanomaterialien und Vorschriften bezüglich Kennzeichnung sowie den Verfahren zur Bewertung der Risiken enthält [EU, 2009].

2.5.2 Aufnahme nanostrukturierter Materie in den Körper

Im Zusammenhang mit der Aufnahme von Nanomaterialien in den Körper sind der Respirationsstrakt, der Gastrointestinaltrakt (GIT) und die Haut zu betrachten. Hierbei bezeichnet das

Wort „Aufnahme“ den Durchtritt durch eine Zellmembran oder Zellschicht, während bspw. die reine Darmpassage und anschließende Ausscheidung über die Fäces nicht zur Aufnahme zählen. Weiterhin ist die Toxikokinetik mit Resorption, Verteilung, metabolischer Umwandlung und Exkretion in diesem Zusammenhang von Bedeutung. So wurde in Studien gezeigt, dass NP nach ihrer Aufnahme in den Körper über Blut und Lymphe auf die einzelnen Organsysteme wie Milz, Leber, Niere, Herz und Blutgefäße verteilt werden können [Meili et al., 2007].

Nachfolgend werden die einzelnen Eintrittspforten mit den jeweiligen Eintrittsbedingungen sowie mögliche Verteilungspfade im Körper beschrieben. Dabei wird vornehmlich auf die Aufnahme von Nanomaterialien über den Respirationstrakt und den GIT eingegangen, da diese Eintrittspforten für die Untersuchungen dieser Arbeit von Relevanz sind.

2.5.2.1 Aufnahme über den Respirationstrakt

Der Respirationstrakt besteht aus einem luftleitenden Abschnitt und einer Region, in der sich der Gasaustausch mit dem Blut vollzieht. Der luftleitende Abschnitt gliedert sich in Nasen-Rachen-Raum, Kehlkopf, Luftröhre, Hauptbronchien und Bronchiolen. Die feinsten Verzweigungen der Bronchiolen bilden die Alveolengänge, die dicht mit Alveolen besetzt sind. Die Alveolen sind mit einem Netz aus Kapillaren überzogen. Die kurze Diffusionsstrecke zwischen Alveolarraum und Kapillare ermöglicht den schnellen Gasaustausch.

Aus Modellrechnungen lässt sich ableiten, dass sich NP insbesondere in Abhängigkeit von ihrer Größe aber auch ihrer Form, Anzahl und Masse in verschiedenen Abschnitten des Atemtraktes abscheiden [Oberdörster et al., 2007]. Die Deposition ist dabei im Wesentlichen diffusionsgetrieben. Impaktion und Sedimentation sowie elektrostatische Kräfte spielen bei größeren bzw. geladenen Partikeln eine Rolle [Meili et al., 2007]. Der Einfluss der Partikelgröße ist in Abb. 2.5 dargestellt.

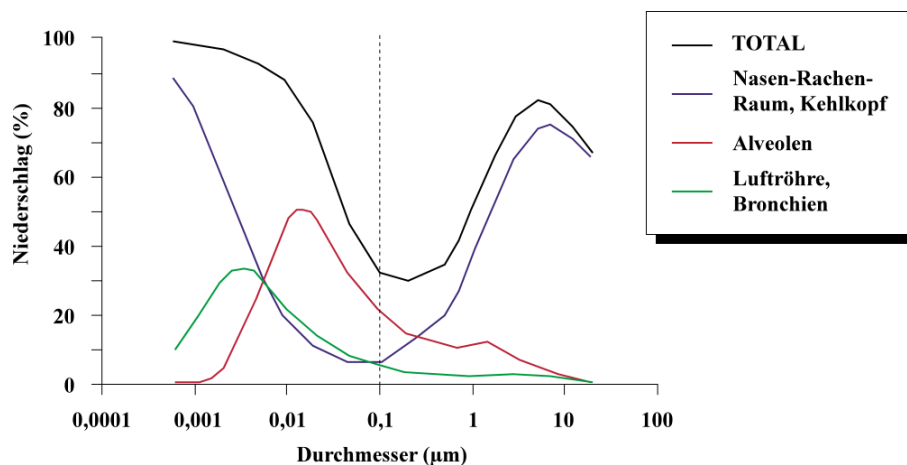


Abbildung 2.5: Niederschlag eingeatmeter Partikel in verschiedenen Regionen des Respirationstrakts in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers bei Einatmung durch die Nase, modifiziert nach Oberdörster et al. [2007].

Eingeatmete Partikel mit einem Durchmesser von 10 μm werden zu 80 % im Respirationstrakt abgeschieden. Bei Partikeln $< 10 \mu\text{m}$ nimmt der Niederschlag ab, erreicht bei einem Durchmesser von ca. 0,5 μm ein Minimum und steigt bei kleiner werdenden Partikeln bis auf 100 % an. Für Materie im nanoskaligen Bereich ($< 0,1 \mu\text{m}$) bedeutet dies, dass die Anzahl der insgesamt im Respirationstrakt abgeschiedenen Partikel mit abnehmender Größe zunimmt. Die Verteilung dieser Größenfraktion im Respirationstrakt stellt sich wie folgt dar: Bis zu einem Durchmesser von 20 nm nimmt mit abnehmender Größe der Anteil alveolgängiger Partikel zu. Bei noch kleineren Partikeln bewirkt deren großes Diffusionsvermögen, dass die Partikel leicht von der Stromlinie der ein- und ausgeatmeten Luft abweichen, aufgrund der Brown'sche Molekularbewegung gegen die Wände der oberen Luftwege prallen und sich dort niederschlagen [Oberdörster et al., 2005a; Kreyling et al., 2006]. Um eine Beziehung zwischen Exposition, Dosis und Wirkung abzuleiten, ist es wichtig zu wissen, wieviel der exponierten Dosis im Atemtrakt zurückgehalten wird. Dies ist u. a. von den natürlichen Reinigungsmechanismen abhängig, die sich in den einzelnen pulmonalen Abschnitten unterscheiden [Oberdörster et al., 1994]. Mit Ausnahme der Alveolen ist das die Luftwege auskleidende Epithel in seiner apikalen Membran mit feinen Flimmerhaaren (Zilien) besetzt und mit Mukus ausgekleidet. Die Zilien sind Teil der unspezifischen mukoziliären Abwehr, die dafür sorgt, dass Fremdkörper gemeinsam mit dem Mukus zum Rachenraum transportiert, verschluckt und vom GIT aufgenommen werden [Kreyling et al., 2006]. Gelangen Partikel bis in die terminalen Luftwege (Alveolarbereich), kommt eine andere Form der Abwehr zum Tragen. Partikel, die bis in diesen Bereich der Lunge vordringen, werden von Makrophagen und dendritischen Zellen mittels Phagozytose aufgenommen. Die Makrophagen setzen daraufhin Chemokine, Cytokine, reaktive Sauerstoffspezies und andere Mediatoren frei, die weitere Makrophagen anlocken [Donaldson et al., 2006] und bewegen sich inklusive der phagozytierten Partikel in Richtung des mukoziliären Klärsystems der oberen Atemwege. „Unverdauliche“ Partikel dagegen verbleiben mit den Makrophagen in der Lunge. Die Folgen reichen von einer harmlosen Verfärbung des Lungenparenchyms bis hin zur Lungenfibrose [Gekle et al., 2010].

Die Elimination von Fremdpartikeln über Makrophagen steht jedoch für gröbere Partikel im Größenbereich zwischen 300 nm und 5 μm im Vordergrund [Peters et al., 1998]. Renwick et al. [2001] konnten zeigen, dass Titandioxid-NP in einem geringerem Ausmaß von alveolaren Makrophagen aufgenommen werden als das Pendant im Mikrometerbereich, woraus eine längere Persistenz dieser Partikel in der Lunge resultiert. Die verbleibenden, schwer löslichen NP können die Epithelschicht des Atemtraktes durchdringen, erreichen den Interstitialraum und können nachfolgend entweder direkt oder auf dem Umweg über die Lymphe in den Blutkreislauf gelangen [Geiser et al., 2005]. Zur Translokation von NP von der Lunge in andere Organe existieren verschiedene tierexperimentelle Studien, wobei die Effizienz der Translokation mit der Nanopartikelart variiert. So zeigte eine Inhalationsstudie an Ratten von Oberdörster et al. [2002] eine 50 %-ige Translokation von Kohlenstoffnanopartikeln in die Leber. Zum Vergleich wurden die in der Studie von Kreyling et al. [2002] untersuchten Iridium-Partikel nach Inhalation durch Ratten zu weniger als 1 % in der Leber vorgefunden.

Eine weitere Studie von Oberdörster et al. [2004] konnte einen Partikeltransfer über den olfrak-

torischen Nerv ins Gehirn nach Inhalation von Kohlenstoff-NP zeigen. Auch eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch rezeptorgesteuerte Endozytose von oberflächenmodifizierten NP wurde bereits festgestellt [Kreuter et al., 2002; Oberdörster et al., 2005a].

Trotz der hiermit gebotenen Möglichkeit einer gezielten Verabreichung von Medikamenten, wirft der Transfer von NP in bestimmte Zielgewebe Fragen nach der Persistenz und den möglichen Langzeiteffekten solcher Partikel auf.

2.5.2.2 Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt

Nanomaterie kann indirekt durch den Mukoziliärtransport oder direkt durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln, die nanoskalige Bestandteile enthalten, in den Gastrointestinaltrakt (GIT) gelangen. Die Anzahl an Studien, die sich mit der Aufnahme und der Translokation von NP im GIT befassen, ist bisher jedoch gering. Die meisten der bisher durchgeführten Studien kommen zudem zu dem Ergebnis, dass NP im Wesentlichen ohne langen Aufenthalt über die Fäces aus dem Körper ausgeschieden werden. So wurde bspw. in einer Rattenstudie [Kreyling et al., 2002], in der das intestinale Verhalten ultrafeiner ^{192}Ir Partikel untersucht wurde, keine Aufnahme festgestellt. Andere Studien konnten dagegen eine geringe Aufnahme von NP über den GIT beobachten. Yamago et al. [1995] stellten fest, dass Ratten oral verabreichte C_{60} -Fullerene nach 48 h zu 98 % mit der Fäces ausgeschieden haben. Die verbleibenden 2 % wurden über den Urin ausgeschieden, was eine systemische Aufnahme voraussetzt. In einer Modellstudie von Jani et al. [1990] wurde die Verteilung unterschiedlich großer Polystyrolpartikel (50 nm - 3 μm) im Rattenkörper untersucht. Hierzu wurde eine Dosis von 1,25 mg/kg Polystyrolpartikel über einen Zeitraum von 10 Tagen täglich per Schlundsonde verabreicht. Partikel einer Größe von 50 - 100 nm (34 % der 50 nm Partikel und 26 % der 100 nm Partikel) wurden von der Mukosa des GIT resorbiert, während mit zunehmender Teilchengröße eine abnehmende Aufnahmerate dieser Partikel beobachtet wurde. Desai et al. [1996] zeigten, dass die gastrointestinale Aufnahme von 100 nm Partikeln in der Ratte 15 - 250 mal höher ist als bei größeren Partikeln. Ferner war die Effizienz der Partikelaufnahme gewebeabhängig, wobei die Aufnahme in den Lymphfollikeln des Dünndarms 2 - 200 mal höher lag als im übrigen Gewebe. Die 100 nm-Partikel diffundierten durch alle Schichten der Submukosa, während größere Partikel vor allem im Epithel gefunden wurden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Partikelaufnahme durch den GIT sowohl von der Partikelgröße, als auch von den Charakteristika deren Oberfläche abhängig sein kann.

Auch wenn durch die aufgeführten Studien eine Aufnahme von Nanomaterie in den Körper über den Magen-Darm-Trakt gezeigt werden konnte, liegen bisher keine aussagekräftigen Studien vor, die eine Toxizität von NP im GIT belegen. Somit besteht in diesem Zusammenhang noch großer Untersuchungsbedarf.

2.5.2.3 Aufnahme über die Haut

Eine mögliche Aufnahme nanostrukturierter Stoffe über die Haut ist durch den zunehmenden Einsatz von synthetischen Nanomaterialien in Kosmetika, Shampoos, Sonnencremes etc. von Bedeutung. Zudem können sich luftgetragene NP auf der Haut ablagern [Meili et al., 2007].

Die Haut bietet im Vergleich zur Lunge oder zum Verdauungstrakt mit ca. 2 m^2 allerdings eine relativ kleine Expositionsfläche (Lunge: 140 m^2 , Darm: $400 - 500 \text{ m}^2$) und stellt, solange sie nicht vorgeschädigt ist, durch ihre dichten Zelllagen eine effektive Barriere gegenüber äußeren Einflüssen dar [Oberdörster et al., 2005a; Pflücker et al., 2001].

So wurde in *in vitro* Penetrationsuntersuchungen kosmetischer Mittel, die nanopartikuläres ZnO oder TiO_2 enthielten, kein Durchdringen der Haut festgestellt [Lademann et al., 1999]. Selbst nach einer Langzeitanwendung wurde der größte Teil der Partikel in der Epidermis vorgefunden.

Eine zusammenfassende Übersicht über Exposition, Aufnahmewege und Verteilung nanostrukturierter Materie im Körper ist in Abb. 2.6 dargestellt.

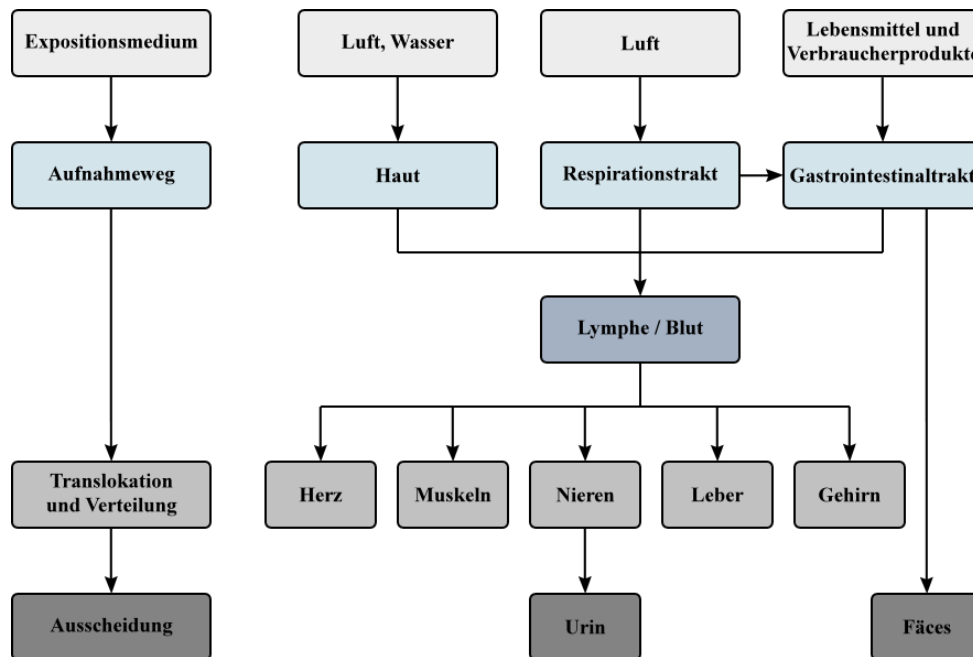


Abbildung 2.6: Übersicht über Exposition, Aufnahmewege und Verteilung nanostrukturierter Materie im Körper, modifiziert nach Meili et al. [2007].

2.5.3 Zelluläre Aufnahme nanostrukturierter Materie

Aufgrund einer möglichen Aufnahme von nanostrukturierter Materie in den Körper sowie deren Translokation zu verschiedenen Zielorganen ist in nächster Konsequenz die zelluläre Aufnahme dieser Stoffgruppe zu betrachten. So konnte bereits in *in vitro* Studien zur Aufnahme von Nanomaterialien in verschiedene Zelltypen sowie in *in vivo* Studien an verschiedenen Tiermodellen die Internalisierung metallischer oder metalloxidischer NP wie Ag-, Au-, Titandioxid-,

Zirkoniumdioxid- oder auch Siliziumdioxid-NP nachgewiesen werden [Kern et al., 2004; Unfried et al., 2007]. Im Folgenden werden die für die Internalisierung nanostrukturierter Materie in Betracht kommenden Aufnahmemechanismen und deren selektive Hemmung beschrieben sowie auf die hierzu bisher existierenden Studien eingegangen.

2.5.3.1 Zelluläre Aufnahmemechanismen und ihre Relevanz für die Aufnahme von nanostrukturierter Materie

Die Aufnahme zellfremden Materials in die Zelle kann durch den Vorgang des Einstülpens und Abschnürens von Teilen der Zellmembran unter Entstehung von Vesikeln, bezeichnet als Endozytose, erfolgen. In Abhängigkeit von Partikelart und Aufnahmemechanismus wird hierbei zwischen zwei verschiedenen Formen der Endozytose unterschieden: Der Phagozytose und der Pinozytose. Die einzelnen Aufnahmemechanismen werden im Folgenden kurz erläutert und sind ergänzend in Abb. 2.7 schematisch dargestellt.

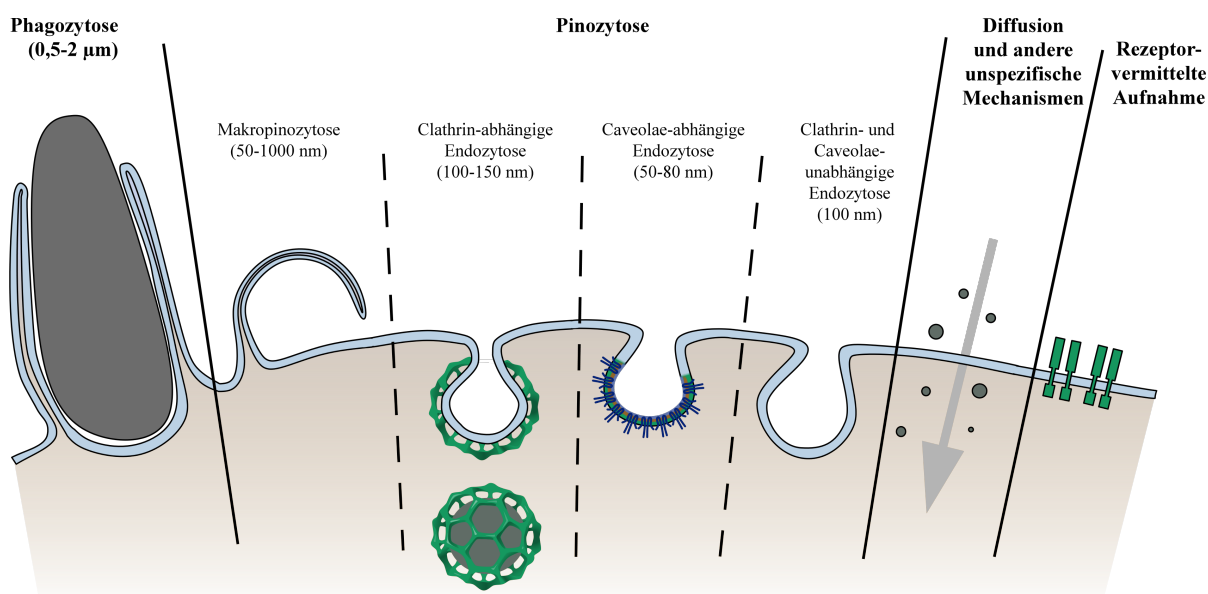


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung möglicher zellulärer Aufnahmemechanismen für nanostrukturierte Materie.

Phagozytose Die Phagozytose ist spezialisierten Zellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder dendritischen Zellen vorbehalten. Sie dient vornehmlich der Aufnahme fester Partikel einer Größe von 0,5 - 2 µm [Krug et al., 2006]. Dieser aktive Prozess wird über spezifische Membranrezeptoren und Rho-GTPasen vermittelte Signalkaskaden reguliert. Infolge einer Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac wird die Polymerisierung des Aktins zu Aktinfilamenten ausgelöst. Dies führt zur Bildung von Plasmaausstülpungen (Pseudopodien), welche die Rezeptor-gebundenen Fremdpartikel vollständig umschließen. Nach Entstehung dieser sog. Phagosomen wird der Abbau des Aktinskeletts eingeleitet und somit die Internalisierung der vesikelumschlossenen Partikel gewährleistet. In nachfolgenden biochemischen Prozessen innerhalb

der Zelle „reifen“ die Phagosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen zu Phagolysosomen, wodurch das internalisierte Material zur lysosomalen Degradierung geführt werden soll [Unfried et al., 2007].

Pinozytose Der Vorgang der Pinozytose bezeichnet die Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeiten und darin gelöster Stoffe in das Zellinnere und wird, wie bereits erwähnt, in Makropinozytose, Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose sowie eine Clathrin- und Caveolae- unabhängige Endozytose unterteilt [Conner und Schmid, 2003; Unfried et al., 2007].

Makropinozytose Die Makropinozytose ist nicht auf einen spezifischen Zelltyp beschränkt und dient der Aufnahme von Partikeln einer Größe bis zu 1 μm [Ivanov, 2008]. Ähnlich der Phagozytose, beinhaltet auch dieser Aufnahmemechanismus eine Aktin-abhängige Bildung von Zellmembranausstülpungen infolge einer Aktivierung von Rho-GTPasen. Im Unterschied zur Phagozytose wird der Fremdkörper jedoch nicht beidseitig umschlossen, sondern durch eine einseitig umhüllende kollabierende Membranausstülpung infolge ihrer Fusion mit der Plasmamembran zu einem Makropinosom internalisiert [Ivanov, 2008]. Der Mechanismus der Fusion konnte jedoch bislang nicht im Detail aufgeklärt werden. Das intrazelluläre Schicksal der Makropinosomen ist je nach Zelltyp unterschiedlich. In der überwiegenden Anzahl der Zelltypen stehen Makropinosomen in engem Kontakt mit dem endosomalen System und verschmelzen mit lysosomalen Kompartimenten [Conner und Schmid, 2003].

Clathrin-abhängige Endozytose Eine weitere Sonderform der Pinozytose stellt die Clathrin-abhängige Endozytose („clathrin-mediated endocytosis“, CME) dar. Dieser Rezeptor-vermittelte Mechanismus basiert auf der Bildung sog. „Clathrin-coated pits“. Diese Bezeichnung erklärt sich folgendermaßen:

Die zu endozytierenden Partikel binden zunächst an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran. Die resultierenden Ligand-Rezeptor-Komplexe konzentrieren sich in besonderen Regionen der Zellmembran, den sog. „pits“ (Vertiefung), an deren Innenseite sich ein Gitter aus Clathrin-Molekülen bildet. Durch weitere Anlagerung von Clathrin-Molekülen in einem komplexen Zusammenspiel mit anderen Proteinen bzw. Proteinkomplexen (u.a. Adapterproteinkomplexe, AP-Komplexe) entsteht ein dreidimensionales Konstrukt eines Durchmessers von 100 - 150 nm, der „clathrin-coated vesicle“ (CCV). An der Abschnürung des Vesikels von der Zellmembran ist das entstehende Dynamin-Supramolekül beteiligt, das sich wie eine Halskrause um das sich abschnürende CCV legt. Dieses erfährt unter Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) eine Konformationsänderung und führt daraufhin zur Ablösung des CCV von der Zellmembran. Die Clathrin-Hülle der Vesikel wird nach kurzer Zeit abgestreift. Hierfür ist ein sog. Chaperon-Protein (Hsc70) verantwortlich, welches unter ATP-Verbrauch die Depolymerisation von Clathrin katalysiert [Conner und Schmid, 2003; Höning et al., 1994]. Nach dem Entfernen der Clathrin-Hülle fusioniert das Vesikel (auch frühes Endosom genannt) mit bestimmten Vesikeln (sog. „sorting vesicle“) zu einem späten Endosom, in dem es infolge eines erniedrigten pH-Wertes (pH 5 - 6)

zur Dissoziation von Rezeptor und Ligand kommt. Während die Rezeptoren durch gezielte Abschnürung kleiner Vesikel wiederverwertet werden, verschmilzt das verbleibende Vesikel mitsamt seiner Fracht mit lysosomalen Kompartimenten [Brodsky et al., 2001; Conner und Schmid, 2003; Mousavi et al., 2004].

Caveolae-abhängige Endozytose Im Zusammenhang mit der Caveolae-abhängigen Endozytose muss zunächst der Begriff der sog. „lipid rafts“ erläutert werden. Als „lipid rafts“ (Lipidflöße) werden Membranmikrodomänen bezeichnet, in denen aufgrund eines höheren Anteils an Glykosphingolipiden, Cholesterol und GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankerten Proteinen eine verringerte Fluidität und somit eingeschränkte seitliche Beweglichkeit vorherrscht [Anderson und Jacobson, 2002].

Der Begriff Caveolae bezeichnet Ω -förmige ca. 50 - 80 nm breite Invaginationen der Plasmamembran. Sie stellen eine Spezialform der „lipid rafts“ dar, wobei das Protein Caveolin als Hauptstrukturelement in der Membran integriert ist. Die Bildung der Caveolae ist durch die Polymerisierung von Caveolin-Molekülen und ihrer anschließenden Bindung an Cholesterol bedingt. Hierdurch wird das Protein immobilisiert und eine Stabilisierung der Vesikelstruktur erreicht. Die Abschnürung der Vesikel erfolgt, der Clathrin-abhängigen Endozytose gleich, Dynamin-vermittelt. Die zelluläre Aufnahme von Caveolae ist, im Gegensatz zu Clathrin-vermittelter Endozytose, kein konstitutiver Prozess. Caveolae stellen statische Strukturen der Plasmamembran dar, die ausschließlich infolge einer Zellstimulation durch Tyrosinphosphorylierung von Caveolae-Bestandteilen in die Zelle aufgenommen werden [Conner und Schmid, 2003].

Die Internalisierung extrazellulärer Materie durch Caveolae ist von besonderem Interesse, da nach dieser Aufnahme internalisiertes Material nicht zu aziden Endosomen und Lysosomen transportiert wird. Statt dessen wird das Gut zu Organellen mit einem neutralen pH-Wert, sog. Caveosomen gebracht, von wo aus weitere Ziele zur Verfügung stehen: Transport zum ER/Golgi, Transzytose oder Freisetzung ins Zytosol [Mineo und Anderson, 2001]. Der detaillierte Mechanismus muss allerdings noch vollständig erforscht werden.

Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose Neben den vorherig beschriebenen Endozytosemechanismen existiert eine unspezifische Art der Endozytose, die in der Literatur nur unzureichend charakterisiert ist [Bishop, 1997; Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001]. Unter dem Begriff Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose werden aktive Aufnahmeprozesse zusammengefasst, die durch Bildung von morphologisch uncharakteristischen Vesikeln in keine der oben beschriebenen Endozytose-Kategorien eingeordnet werden können [Lüllmann-Rauch, 2003].

Im Zusammenhang mit der Internalisierung nanostrukturierter Materie lässt sich kein einheitlicher Aufnahmemechanismus feststellen. Vielmehr konnten in einer Vielzahl von Studien sämtliche vorherig beschriebenen Formen der Endozytose aber auch unspezifische Aufnahmemechanismen wie Diffusion beobachtet werden. Welcher der genannten Mechanismen im einzelnen Fall auftritt, ist dabei von mehreren Faktoren abhängig [Unfried et al., 2007]:

- Physikochemische Eigenschaften der Partikel, wie z. B. Größe, chemische Zusammensetzung, Form, Ausmaß der Agglomeration und Oberflächeneigenschaften.
- Experimentelle Bedingungen der *in vitro* Testsysteme, die das natürliche Umfeld der Zelle widerspiegeln sollen und die Oberfläche von NP verändern können (z.B. Opsonierung durch Serumkomponenten, Modifizierung durch Proteine, z. B. Albumin).
- Charakteristika der Zielzelle, d. h. Zelltyp und Differenzierung, die dafür ausschlaggebend sein können, ob eine Aufnahme stattfindet oder nicht, bzw. welcher Mechanismus zum Tragen kommt.

Der Einfluss der aufgeführten Parameter auf die Internalisierung nanostrukturierter Materie bzw. den jeweilig ausgelösten Aufnahmemechanismus wurde in einzelnen Studien in unterschiedlichem Umfang festgestellt, was nachfolgend anhand ausgesuchter Beispiele aus der Literatur verdeutlicht werden soll.

Den Einfluss der Partikel-Größe betreffend wurden in einer Studie von Rejman et al. [2004] in Abhängigkeit des Durchmessers fluoreszenzmarkierter Polystyrol-Partikel unterschiedliche Aufnahmemechanismen festgestellt. Während Partikel eines Durchmessers < 200 nm Clathrin-abhängig internalisiert wurden, erfolgte die Aufnahme größerer Partikel Caveolae-vermittelt. Lohbach et al. [2006] haben im Rahmen einer Untersuchung Chitosan-beschichteter Partikel in einem Durchmesserbereich von 50 - 1000 nm gleichermaßen eine größenabhängige Aufnahme mittels Phagozytose beobachten können, wobei Partikel eines Durchmessers von 50 nm am effektivsten internalisiert wurden. Diese Beobachtung konnte gleichwohl von Limbach et al. [2005] an Untersuchungen mit Ce_2O_3 -NP gemacht werden. Daneben konnte auch die Aufnahme von Agglomeraten mittels Phagozytose festgestellt werden [Takenaka et al., 2001].

Unklarheit herrscht in diesem Zusammenhang über den Einfluss der Oberflächenladung, da hierzu weitestgehend gegensätzliche Studien vorliegen. Roser et al. [1998] konnten eine erhöhte Internalisierungsrate positiv geladener Albumin-NP durch den Vorgang der Phagozytose im Vergleich zu ungeladenen Teilchen zeigen, während Foged et al. [2005] diesbezüglich keine Beeinflussung beobachteten. Dagegen wurde durch Geiser et al. [2005] für negativ geladene Polystyrol-NP eine unspezifische Aufnahme durch Diffusion in Epithelzellen eines Zervixkarzinoms gezeigt.

Auch in Bezug auf den Einfluss einer Partikelopsonierung kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Moore et al. [1997] konnten beobachten, dass Plasma-opsonierte FeO-NP vornehmlich über Phagozytose internalisiert wurden, während nicht-opsonierte NP Ziel einer pinozytotischen Aufnahme waren. In der bereits erwähnten Studie von Rejman et al. [2004] wurden in Abhängigkeit der Oberflächenmodifikation mit Albumin ebenfalls unterschiedliche Aufnahmemechanismen festgestellt. Während Albumin-beschichtete NP Clathrin-abhängig endozytiert wurden, trat für unbeschichtete Partikel die Caveolae-vermittelte Endozytose in den Vordergrund.

Eine durch die Charakteristika der eingesetzten Zelllinie aufgrund von spezifischen Membraneigenschaften bzw. der Rezeptorausstattung der Zellmembran beeinflusste Aufnahme nanostrukturierter Materie wurde ebenfalls in einigen Studien untersucht und führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. So haben Zhang et al. [2002] eine weitaus geringere Internalisierung

Polyethylenglykol- bzw. Folsäure-beschichteter NP durch Makrophagen im Vergleich zu Krebszellen beobachtet. In weiteren Studien zur zellulären Aufnahme von Nanomaterialien in Makrophagen und dendritischen Zellen wurden sowohl der Vorgang der Phagozytose [Raynal et al., 2004; Rogers und Basu, 2005] als auch pinozytotische Mechanismen [Shukla et al., 2005] festgestellt. Dagegen haben Lesniak et al. [2005] für Ag-NP eine Zelltyp-unabhängige Aufnahme in Epithelzellen, Monozyten oder Fibroblasten gesehen. Ag-Dendrimere und nanostrukturiertes Ag⁰ konnten sowohl frei im Zytoplasma als auch eingeschlossen in endozytotischen Vesikeln vorgefunden werden, was auf deren Aufnahme über einen passiven (Diffusion) wie auch aktiven Mechanismus (Endozytose) schließen lässt.

Passive d.h. ATP-unabhängige Internalisierungsprozesse, die eine Aufnahme über Diffusion oder eine adhäsive Interaktion zwischen Zellmembran und NP vermuten lassen, konnten in zahlreichen *in vitro* sowie einigen *in vivo* Studien festgestellt werden. Eine auf Diffusion basierende Internalisierung wurde bspw. für TiO₂- [Geiser et al., 2005] und Ag-NP [Takenaka et al., 2001] nachgewiesen. Solch ein passiver Aufnahmeweg impliziert einen direkten Zugang nanostrukturierter Materie zu intrazellulären Proteinen, Organellen oder der DNA. Allerdings können auch in diesem Zusammenhang keine charakteristischen Eigenschaften nanostrukturierter Materie, welche diesen Aufnahmemechanismus bedingen, herausgestellt werden.

Insgesamt betrachtet, weist die derzeitige Datenlage zur zellulären Aufnahme von Nanomaterialien viele Diskrepanzen auf und macht weiterführende Studien erforderlich. Das intrazelluläre Schicksal nanostrukturierter Materie wird maßgeblich durch die Aufnahmeart und das sich daran anschließende intrazelluläre „Trafficking“ bestimmt. NP einer Art können so, abhängig vom Aufnahmemechanismus, unterschiedliche Effekte hervorrufen, je nachdem zu welcher zellulären Struktur sie transportiert werden. Auch die Aktivierung, bzw. Inaktivierung verschiedener Signalwege ist mit der Art der Aufnahme in die Zelle verbunden [Unfried et al., 2007]. Aus den genannten Gründen ist es von tragender Bedeutung, den jeweiligen Aufnahmemechanismus identifizieren zu können.

Neben einer elektronenmikroskopischen Visualisierung vorliegender Aufnahmemechanismen, kann durch eine selektive Hemmung einzelner Endozytoseformen Aufschluss über den jeweiligen Internalisierungsweg gewonnen werden.

2.5.3.2 Selektive Hemmung zellulärer Aufnahmemechanismen

Die einzelnen Aufnahmemechanismen lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber pharmakologischen bzw. chemischen Hemmstoffen voneinander abgrenzen. Der Einsatz pharmakologischer Hemmstoffe bietet Vorteile gegenüber Methoden auf molekularbiologischer Ebene, welche Veränderungen der Expressionsrate an Endozytoseprozessen beteiligter Proteine zum Ziel haben. Zum einen werden alle Zellen einer Population in gleicher Weise beeinflusst, womit die Quantifizierung von Effekten erleichtert wird. Zum anderen wird durch die üblicherweise kurze Expositionsdauer gegenüber diesen Hemmstoffen der Entstehung von späten Nebenwirkungen oder kompensierenden Prozessen vorgebeugt. Darüber hinaus stellt der Einsatz selekti-

ver Hemmstoffe das bevorzugte Verfahren für *in vivo* Studien dar und erweist sich als effizient und besonders kostengünstig. Die Effizienz wird allerdings maßgeblich von der Selektivität ihrer Wirksamkeit bestimmt und stellt vereinzelt infolge gleichzeitiger Beeinflussung alternativer Aufnahmemechanismen ein Problem dar [Ivanov, 2008].

Nachfolgend wird eine Auswahl der am weitesten verbreiteten Hemmstoffe aufgeführt und bezüglich ihrer Selektivität, ihrer Wirkweise und eventuell vorhandener Nebenwirkungen diskutiert. Dabei wird die Hemmung der Phagozytose und Makropinozytose aufgrund ähnlicher mechanistischer Prinzipien beider Internalisierungsformen zusammengefasst dargestellt.

Phagozytose/Makropinozytose Trotz der Tatsache, dass Phagozytose bzw. Makropinozytose zu den am längsten bekannten Endozytoseformen gehören, konnten bisher nur wenige spezifische Hemmstoffe bestimmt werden, welche ihre Identifizierung erlauben. Der Grund liegt darin, dass im Vergleich zur Clathrin- oder Caveolae-abhängigen Endozytose kein spezifisches Protein oder Lipid als Zielstruktur festgestellt werden konnte. Eine Hemmung kann jedoch durch den Einsatz spezifischer Reagenzien, die folgende Prozesse einleiten, erreicht werden:

- F-Aktin-Depolymerisierung durch den Einsatz von Cytochalasin D oder Larunculin. Dabei wird die Depolymerisierung durch Veränderung der Aktinfilamente (Cytochalasin D) bzw. Bindung an Aktinmonomere (Larunculin) erreicht [Peterson und Mitchison, 2002]. Jedoch handelt es sich hierbei vielmehr um unselektive Breitband-Hemmstoffe.
- Beeinflussung des Phosphatidylinositol-Metabolismus durch Inhibierung der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) oder der PLC (Phosphatidylinositol-Phospholipase C) [Amyere et al., 2000; Araki et al., 1996].

Diese Enzyme spielen bei der Bildung und Fusion intrazellulärer Vesikel sowie bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts eine tragende Rolle. Geeignete Hemmstoffe sind Wortmannin (PI3K) und Nitrocarboxyphenyl-*N,N*-diphenylcarbamate (PLC). Allerdings wird durch PI3K- und PLC-Inhibitoren gleichermaßen die Internalisierung via CCV und Caveolae beeinträchtigt.

- Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschs durch den Einsatz von Amilorid und seiner Derivate, wie bspw. Dimethylamilorid [Lagana et al., 2000]. Jedoch existieren Studien, die eine Beeinflussung des intrazellulären Vesikel-„Trafficking“ sowie des Zytoskeletts durch Amilorid und seine Derivate belegen [Ivanov, 2008; Lagana et al., 2000].

Clathrin-abhängige Endozytose Die Clathrin-abhängige Endozytose ist ein bereits im Detail aufgeklärter Prozess, weswegen eine Vielfalt an möglichen Hemmstoffen und Inhibierungsansätzen bekannt ist:

- Unterbindung der Zusammenlagerung von Clathrin-Molekülen durch den Einsatz einer hypertonischen Saccharose-Lösung oder durch eine Depletion des Kalium-Gehalts [Hansen et al., 1993].

Ersteres gilt als Indiz für eine Clathrin-vermittelte Aufnahme extrazellulärer Materials. Dennoch können auch andere Aufnahmewege wie die Makropinozytose oder Caveolae-vermittelte Endozytose durch deren Einsatz beeinflusst werden [Ivanov, 2008]. Daneben kann eine Schrumpfung der Zelle verursacht werden, die ihrerseits eine Stimulation des Ionentransports und somit eine Aktivierung intrazellulärer Kinasen und den Umbau des Aktin-Zytoskeletts nach sich zieht. Die Depletion des Kalium-Gehalts stellt den nutzbringenderen Inhibierungsansatz dar, da hierbei der Einfluss auf andere Endozytoseformen geringer ausfällt. Jedoch ist auch hierbei eine Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts denkbar [Ivanov, 2008].

- Verhinderung der Ausbildung von „Clathrin-coated pits“ durch zytosolische Ansäuerung mittels NH_4Cl oder schwachen organischen Säuren [Hansen et al., 1993; Yao et al., 2002]. Die Nebenwirkungen sind denen durch hypertonische Saccharose-Lösung und Depletion des Kalium-Gehalts hervorgerufenen ähnlich [Ivanov, 2008].
- Dissoziation von Clathrin-Molekülen und AP-Komplexen von der Plasmamembran durch Einsatz des kationischen amphipathischen Phenothiazin-Derivats Chlorpromazin (50 - 100 μM) [Yao et al., 2002].

Eine Beeinflussung der Caveolae-vermittelten Endozytose durch Chlorpromazin ist nicht bekannt. Jedoch kann sich dieses Reagenz aufgrund seines amphipathischen Charakters in die Zellmembran einlagern, somit zu einer erhöhten Membranfluidität führen und durch Störung der Bildung von Invaginationen den Vorgang der Phagozytose und Makropinozytose beeinträchtigen [Ivanov, 2008].

- Stabilisierung von „Clathrin-coated pits“ durch den Einsatz von Monodansylcadaverin (MDC) in Konzentrationen von 100 - 300 μM .

MDC stellt einen relativ selektiven Hemmstoff dar. Eine Beeinflussung der Caveolae-vermittelten Endozytose ist aus der Literatur nicht bekannt. Über die Wechselwirkung mit anderen Internalisierungswegen wie Makropinozytose oder Phagozytose wird jedoch kontrovers diskutiert [Schlegel et al., 1982].

Caveolae-abhängige Endozytose Für die Mehrheit der Hemmstoffe der Caveolae-abhängigen Endozytose stellt das in den „lipid rafts“ enthaltene Membranlipid Cholesterol den Hauptangriffspunkt dar. Zu dessen Beeinflussung werden vier verschiedene Strategien verfolgt:

- Inhibierung der Cholesterol-Biosynthese durch den Einsatz von Statinen in Konzentrationen von 10 - 100 μM [Liao und Laufs, 2005; Tobert, 2003].

Statine wie Lovastatin oder Simvastatin hemmen die HMG-CoA (3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A) Reduktase, ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym bei der Cholesterol-synthese. Allerdings ist dieser Eingriff in den Cholesterolhaushalt mit einer Beeinflussung anderer Endozytoseformen wie der Makropinozytose und der Clathrin-vermittelten Endozytose verbunden und schränkt damit die Selektivität dieser Hemmstoffe ein [Sidaway et al., 2004].

- Depletion von Cholesterol durch den Einsatz von Methyl- β -cyclodextrin ($\text{M}\beta\text{CD}$) in einem

Konzentrationsbereich von 5 - 10 mM [Smart und Anderson, 2002].

M β CD ist ein Heptasaccharid mit einer toroidalen Struktur, dessen hydrophober Kern eine hohe Affinität zu Cholesterol besitzt [Irie et al., 1992]. Seine Applikation führt zur Bildung von löslichen β -Cyclodextrin/Cholesterol-Einschlusskomplexen, wodurch Cholesterol der Zellmembran entzogen wird. Auch in Zusammenhang mit diesem Hemmstoff sind in der Literatur jedoch Auswirkungen auf andere Aufnahmewege wie der Clathrin-vermittelten Internalisierung beschrieben [Rodal et al., 1999].

- Akkumulation von Cholesterol in durch Polyen-Antibiotika wie Nystatin oder Filipin gebildeten Aggregaten.

Üblicherweise eingesetzte Konzentrationen sind für Nystatin 20 - 50 μ M und für Filipin 1 μ M. Die Aggregatbildung löst Distorsionen innerhalb der Membranstruktur aus und beeinträchtigt die Funktion cholesterolreicher Domänen, inklusive der Caveolae [Ros-Baro et al., 2001]. Die Polyen-Antibiotika gewähren aufgrund ihrer selektiven Wirkung eine Unterscheidung zwischen Caveolae- und Clathrin-abhängiger Endozytose [Liao und Laufs, 2005; Smart und Anderson, 2002]. Mögliche Nebenwirkungen beinhalten u.a. die Permeabilisierung der Zellmembran durch Filipin aufgrund seiner Interaktion mit Phospholipiden. Allerdings tritt dieser Nebeneffekt nur bei hohen Konzentrationen ($> 10 \mu$ M) auf, und kann somit durch entsprechende Dosierung minimiert werden [Ivanov, 2008].

- Enzymatische Modifikation des Membrancholesterols mithilfe von Cholesteroloxidasen.

Durch Oxidation des Cholesterols werden die Eigenschaften der Caveolae, u.a. durch die nachfolgend bedingte Translokation der Caveolin-Moleküle von der Zellmembran, erheblich verändert [Smart et al., 1994]. Dieser Inhibierungsansatz stellt sich, im Vergleich zu den vorherig genannten Methoden, aufgrund der Substratspezifität des Enzyms als besonders selektiv dar. Allerdings ist die Funktionalität der Cholesteroloxidasen von vielerlei Faktoren, wie der Phospholipid-Zusammensetzung, dem Oberflächendruck der Membran oder der Ionenstärke, abhängig, wodurch diese Methode geringe Anwendung findet [Lange, 1992].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass keiner der genannten Hemmstoffe absolute Selektivität bezüglich eines bestimmten Aufnahmemechanismus aufweist. Dennoch hat sich ihre Anwendung in systematischen Testverfahren (Screenings) sowie in Kombination mit modernen molekularen Methoden als nützlich erwiesen und vermag in Zukunft nach eingehenderer Erforschung einzelner Endozytoseformen ausgeweitet werden [Ivanov, 2008].

2.5.4 Biologische Wirkungen nanostrukturierter Materie

Nach ihrer zellulären Aufnahme kann nanostrukturierte Materie eine Vielzahl an biologischen Wirkungen entfalten, welche in Abhängigkeit des jeweiligen Nanomaterials sehr unterschiedlich ausfallen können. Jede nanoskalige Erscheinungsform muss demnach für sich selbst betrachtet und in ihrem Wirkprofil untersucht werden. Dennoch konnten in einigen Studien gewisse Analogien im Wirkmechanismus einzelner NP-Arten gezeigt werden, die vornehmlich auf der Generierung

von reaktiven Spezies (RS) basieren [Donaldson et al., 2006; Krug et al., 2006; Oberdörster et al., 2005a; Unfried et al., 2007].

Im Folgenden soll ein Einblick in die biologischen Wirkungen von Nanomaterialien gegeben werden. Dabei wird insbesondere auf die Bildung von RS im Zusammenhang mit einer Modulation des zellulären Redoxstatus, die Ausschüttung Entzündungs-assoziiierter Proteine infolge eines Einflusses auf zelluläre Signalkaskaden sowie eine mögliche Beeinflussung der genomischen Integrität eingegangen.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass hierbei lediglich ein Ausschnitt aus der bisherigen Datenlage und die daraus resultierenden Folgerungen bezüglich eines überwiegend zutreffenden Wirkprofils dargestellt werden.

2.5.4.1 Beeinflussung des zellulären Redoxstatus als Schlüsselereignis biologischer Wirkungen

Verschiedene *in vitro*- und *in vivo*- Studien haben gezeigt, dass Nanoobjekte wie Fullere, Kohlenstoffnanoröhren, Quantum Dots und Abgaspartikel die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auslösen können [Donaldson et al., 2005; Mühlfeld et al., 2008; Unfried et al., 2007]. Dabei kann die ROS-Bildung zum einen durch die Partikel selbst [Wilson et al., 2002] und zum anderen durch die aus ihrer Herstellung herrührenden Rückstände bedingt sein [Pulskamp et al., 2007].

Des Weiteren kommt in diesem Zusammenhang der Interaktion von NP mit subzellulären Strukturen, wie den Mitochondrien, membrangebundenen Enzymkomplexen (NADPH-Oxidasen) oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), die in komplexe biologische Redoxprozesse involviert sind, große Bedeutung zu.

Mitochondrien werden seit langem als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies, wie dem Superoxidradikal oder Wasserstoffperoxid, durch Reduktion molekularen Sauerstoffs in der Atmungskette beschrieben [Chance et al., 1979]. Etwa 3 - 10 % des dort umgesetzten Sauerstoffs werden nicht entsprechend reduziert [Simkó et al., 2009]. Es wird angenommen, dass eine Interaktion zwischen NP und mitochondriellen Strukturen Einfluss auf den mitochondriellen Elektronenfluss bzw. -verlust nimmt. Wenngleich es bisher keinen direkten Beweis für eine Störung des mitochondriellen Elektronenflusses durch NP gibt, konnten einige Studien an Nanomaterialien wie u.a. Fullerenen [Foley et al., 2002], Ag-beschichteten Au-NP [Oberdörster et al., 2005a] oder auch MWCNT [Zhu et al., 2006] eine Erhöhung des zellulären ROS-Gehalts in Zusammenhang mit einer Schädigung dieser Zellorganellen sowie einer Lokalisation nanostrukturierter Materie innerhalb der Mitochondrien feststellen [Jia et al., 2005; Li et al., 2003; Hussain et al., 2005; Xia et al., 2006].

Des Weiteren kann eine Interaktion von NP mit Mitochondrien oder dem ER eine Störung der Calciumionen (Ca^{2+})-Homöostase zur Folge haben, was aufgrund einer Aktivierung von Calmodulin-abhängigen Enzymen wie der Stickstoff-Monooxygenase wiederum zur einer vermehrten Bildung von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) führt.

Darüber hinaus wurde in mehreren Studien ein Einfluss von NP auf den Gehalt des zellulären Antioxidans Glutathion (GSH) nachgewiesen. So konnten u.a. Hussain et al. [2005] oder Montellier et al. [2007] nach Exposition gegenüber metalloxidischen (TiO_2) sowie metallischen NP (Ag, Ni und Co) eine Depletion des zellulären GSH-Gehalts feststellen. Eine verminderte antioxidative Kapazität der Zelle erhöht deren Anfälligkeit gegenüber Elektrophilen.

Ausgehend von einer Störung der mitochondrialen Funktionalität und dem daraus möglicherweise resultierenden Anstieg des zellulären ROS-Gehalts sowie einer durch NP direkt verursachten ROS- bzw. RNS-Bildung und einer verminderten antioxidativen Kapazität können sich nachhaltige Konsequenzen für die Zelle ergeben. Darunter stehen Folgen wie die Schädigung von Makromolekülen wie Membranlipiden, Proteinen oder der nukleären und mitochondrialen DNA durch deren Oxidation sowie eine Beeinflussung zellulärer Signalkaskaden, welche Prozesse der Zellproliferation, Apoptose (Zelltod) und Entzündungsprozesse steuern, im Vordergrund [Halliwell, 2006].

2.5.4.2 Beeinflussung zellulärer Signalkaskaden und Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren

Die Induktion von Signalkaskaden durch nanostrukturierte Materie wurde bisher weitestgehend nach inhalativer Exposition untersucht [Oberdörster et al., 2005b]. Die Vielfalt der in diesen Studien untersuchten NP reicht von CDNP, über diverse metallische NP bis hin zu metalloxidischen NP der Elemente Titan, Zirkonium und Silizium [Alessandrini et al., 2006; Donaldson et al., 2006; Lucarelli et al., 2004; Muller et al., 2005; Rothen-Rutishauser et al., 2007]. Trotz der stark voneinander abweichenden physikochemischen Eigenschaften dieser NP-Klassen, betreffend Größe, Form, Aggregationsverhalten, Löslichkeit und Zusammensetzung, konnte in diesen Studien die Freisetzung inflammatorischer Marker, wie den Interleukinen IL-1, IL-6 oder IL-8, als übereinstimmender Untersuchungsendpunkt festgestellt werden.

Dabei wurde die Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, wie dem „nuclear factor κ -B (NF κ B)“ und dem „activating protein-1 (AP-1)“, infolge der Induktion von oxidativem Stress bzw. der Freisetzung von ROS als Schlüsselereignis identifiziert [Pourazar et al., 2005; Unfried et al., 2007].

Die induzierbaren Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 regulieren zahlreiche Zielgene und spielen bei unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie u.a. bei der Regulation von Entzündungsprozessen oder der Zellproliferation, eine zentrale Rolle [Adcock, 1997]. Brown et al. [2004] konnten in Untersuchungen mit Alveolarmakrophagen, welche ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln ausgesetzt wurden, die Aktivierung jener Transkriptionsfaktoren herausstellen. In dieser Studie wurde die Expression und Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α) beobachtet. Die Translation von TNF- α wird durch die Aktivierung und anschließende Translokation von NF κ B in den Zellkern induziert und regt ihrerseits die Ausschüttung anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie dem Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) an, die lokale und systemische Entzündungsreaktionen steuern.

Begründet in der Tatsache, dass die nukleäre Translokation von NF κ B und die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 vom intrazellulären Ca²⁺-Gehalt abhängig sind, wurde diese Beobachtung dadurch bestätigt, dass, neben der Ausschüttung von TNF- α , ein zunehmender Zustrom von Ca²⁺ in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Kohlenstoff-NP festgestellt werden konnte. Weiterhin konnte ein vom Partikeldurchmesser abhängiger Einfluss beobachtet werden: Während Kohlenstoff-NP eines Durchmessers von 14 nm den intrazellulären Ca²⁺-Gehalt konzentrationsabhängig erhöhten, konnte dieser Effekt für Partikel gleicher Zusammensetzung aber eines Durchmessers von 260 nm nicht beobachtet werden [Brown et al., 2004; Unfried et al., 2007].

Im Zusammenhang mit der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 wurde zur Aufklärung vorgeschalteter Ereignisse in zahlreichen Studien besonderes Augenmerk auf die mitogen aktivierbare Proteinkinase (MAPK)-Kaskade gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl NF κ B als auch AP-1 durch die MAPK-Kaskade infolge der Induktion von oxidativem Stress nach Exposition gegenüber nanoskaliger Materie aktiviert werden können [Byrne und Baugh, 2008; Mühlfeld et al., 2008; Mroz et al., 2007; Pacurari et al., 2008; Unfried et al., 2007]. Dabei sind an der Aktivierung von AP-1 innerhalb der MAP-Kinase Familie sowohl extrazellulär regulierte (ERK) als auch stressinduzierbare Kinasen wie die p38-Kinase (p38 MAPK) und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) beteiligt [Karin et al., 1997; Pacurari et al., 2008]. Die Regulation der NF κ B-Aktivierung wurde vornehmlich über eine Beeinflussung JNK vorgeschalteter MAP-Kinasen gesteuert [Ding et al., 2001; Pacurari et al., 2008].

Eine Aktivierung von MAP-Kinasen resultiert in einem breiten Spektrum oft entgegengesetzter Effekte. Daher ist das Wissen um eine spezifische Aktivierung verschiedener Mitglieder dieser Proteinfamilie in Abhängigkeit von der NP-Spezies, auch insbesondere im Hinblick auf die damit verbundenen pathogenen Endpunkte, von großer Bedeutung. Bislang konnte die Freisetzung des pro-inflammatorischen Interleukin-8 nach Exposition gegenüber Kohlenstoff-NP sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Untersuchungen mit einer Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Zusammenhang gebracht werden [Kim et al., 2005]. Die Bedeutung der MAP-Kinasen ERK und JNK bleibt in diesem Kontext indes noch weitestgehend unklar [Unfried et al., 2007].

Ausgehend von der Induktion der MAPK-Kaskade durch NP wurde als mögliches initiales Ereignis die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK), wie des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), untersucht. Der EGFR kann neben seiner Aktivierung durch die Bindung spezifischer Liganden, wie u.a. dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Amphiregulin oder dem Heparin-bindenden EGF (Hb-EGF) [Bazley und Gullick, 2005; Gullick, 2001; Olayioye et al., 2000] auch durch oxidativen Stress aktiviert werden [Abdelmohsen et al., 2003]. Eine ROS-bedingte Proliferation infolge einer Aktivierung des EGFR konnte in Untersuchungen mit ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln durch Tamaoki et al. [2004] sowie Sydlik et al. [2006] gezeigt werden.

Einige Studien haben zudem gezeigt, dass die Expression von EGFR-Liganden, wie dem Hb-EGF oder Amphiregulin, durch ultrafeine Kohlenstoffpartikel induziert werden kann [Blanchet et al., 2003].

Neben der Aktivierung des EGFR konnte gleichermaßen die Mitwirkung weiterer Transmembran-Rezeptoren, der sog. Integrine, an der Induktion der MAP-Kinasen beobachtet werden [Sydlik et al., 2006; Unfried et al., 2007]. Integrine sind heterodimere Proteine bestehend aus zwei nicht-kovalent verbundenen Glykoproteinketten, einer α - und einer β -Untereinheit. Sie sind vor allem an der Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt und geben u.a. Signale, die von der Matrix kommen, an das Zytoskelett der Zelle weiter. Dieser Prozess ist von enormer Bedeutung für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung, steht aber auch mit dem Vorgang des programmierten Zelltods (Apoptose) in Zusammenhang [Clark und Brugge, 1995]. Sydlik et al. [2006] haben gezeigt, dass die Beteiligung der Integrine an der Signalübermittlung die Zellantwort beeinflusst. Untersucht wurden NP unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung (Kohlenstoff- und SiO_2 -NP), die gleichermaßen zu einem Proliferationsstimulus und zur Apoptose geführt haben. Dabei hat sich der Proliferationsstimulus als ERK-vermittelt herausgestellt, während die Einleitung der Apoptose durch Aktivierung der JNK ausgelöst wurde. Durch Inaktivierung der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit konnte ein Rückgang des proliferationsstimulierenden Effekts beobachtet werden, die JNK-vermittelte Apoptose blieb hingegen unbeeinflusst.

Diese Studie stellt die Bedeutung der Membranbeschaffenheit für die durch nanostrukturierte Materie ausgelöste Zellantwort heraus und rückt die Notwendigkeit Zelltyp-spezifischer Studien in den Vordergrund.

2.5.4.3 Beeinflussung der genomischen Integrität

Ein erhöhter ROS- bzw. RNS-Gehalt kann, neben den Auswirkungen auf andere Biomoleküle, zu oxidativer Schädigung der DNA führen. Dabei können sowohl die DNA-Basen als auch die Desoxyribosereste oder das Phosphodiesterückgrat betroffen sein. Ein oxidativer DNA-Schaden kann u.a. durch Fehlpaarung von Basen Mutationen hervorgerufen werden, was hinsichtlich einer Krebsentstehung von Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang ist als Beispiel insbesondere die Oxidation der DNA-Base Guanin durch das Hydroxylradikal ($\text{OH}^\cdot$) zum 8-Oxo-Guanin zu nennen. Die Mutagenität von 8-Oxo-Guanin liegt in der veränderten Basenpaarung von Guanin mit Adenin an Stelle von Cytosin begründet [Grollman und Moriya, 1993].

Eine ROS-vermittelte und demnach indirekt verursachte DNA-Schädigung nach Exposition gegenüber nanostrukturierter Materie wurde bereits in einer Vielzahl von Studien gezeigt [Don Porto Carero et al., 2001; Dybdahl et al., 2004; Gurr et al., 2005; Unfried et al., 2007]. So konnte bspw. für TiO_2 -NP eines Durchmessers von 10 - 20 nm, für das C_{60} -Fulleren aber auch für Industriearbeit eine Schädigung der DNA durch Oxidation nachgewiesen werden [Gurr et al., 2005]. Der Mechanismus, durch den TiO_2 -NP ohne weitere Photosensibilisierung oxidative DNA-Läsionen verursachen, bleibt noch zu erforschen. Im Falle des Industriearbeiters bzw. von CDNP wird die oxidative DNA-Schädigung auf die darin enthaltenen metallischen NP zurückgeführt [Knaapen et al., 2004; Schins und Hei, 2006].

Neben einer indirekten Schädigung der DNA über RS, können Nanomaterialien auch direkt mit der DNA wechselwirken. Hierzu muss ihr Transport in den Zellkern gewährleistet sein. Der nukle-

äre Transport von NP kann auf zwei verschiedene Wege erfolgen: Entweder durch Wechselwirkung mit der Kernmembran nach spezieller Oberflächenbeschichtung z.B. mit Phospholipiden [Godbey et al., 1999] oder aufgrund von Diffusion durch Kernporen bzw. nukleoplasmatische Transportsysteme. Die Diffusion durch die Kernporen kann passiv, d.h. ohne Einbindung von Komponenten des Kernporenkomplexes (KPK) in den Transportprozess, oder aktiv nach Interaktion zwischen der translozierenden Spezies und Bestandteilen des KPK erfolgen [Unfried et al., 2007].

Eine Aufnahme nanostrukturierter Materie in den Zellkern konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden [Chen und von Mikecz, 2005; Hoshino et al., 2004; Pante und Kann, 2002; Porter et al., 2006; Roser et al., 1998]. Darunter sind exemplarisch die nukleäre Aufnahme spezifisch beschichteter Au-NP eines Durchmessers von 24 - 39 nm über den Kernporenkomplex [Pante und Kann, 2002] sowie die durch Hoshino et al. [2004] gezeigte Translokation Ligand-konjugierter QD nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten zu nennen. Der Aufnahmemechanismus unkonjugierter NP wie SiO₂-QD ist hingegen unaufgeklärt und wirft vielmehr die Frage auf, ob NP eines Durchmessers < 10 nm für ihre Aufnahme in den Zellkern spezifischer Wechselwirkungen mit Komponenten des Kernporenkomplexes bedürfen [Unfried et al., 2007].

Darüber hinaus ist auch eine Interaktion zwischen NP und Chromosomen oder dem mitotischen Spindelapparat während der Mitose nach Auflösung der Kernmembran denkbar, wie es anhand einer Induktion von Mikrokernen nach NP-Exposition gezeigt werden konnte [Gurr et al., 2005; Rahmann et al., 2002].

Eine Schädigung genomischer DNA kann schwere pathophysiologische Folgen für Zellen bzw. Gewebe nach sich ziehen [Hoeijmarkers, 2001]. Auf zellulärer Ebene ergeben sich in Abhängigkeit von der Art und dem Ausmaß der Schädigung folgende Konsequenzen:

- Induktion dauerhafter Veränderungen des Genoms (Mutationen),
- Induktion eines Zellzyklus-Arrestes.
- Aktivierung von Signaltransduktionswegen, welche die Apoptose einleiten [Schins und Hei, 2006].

Dabei können Mutationen sowohl durch strukturelle als auch numerische Chromosomenaberrationen hervorgerufen werden. Zur Aufrechterhaltung der DNA-Integrität stehen der Zelle zahlreiche effiziente DNA-Reparaturmechanismen zur Verfügung [Sato und Lindahl, 1994; Hoeijmarkers, 2001]. In diesem Zusammenhang besteht für die Zelle die Möglichkeit nach DNA-Schädigung einen Zellzyklus-Arrest einzuleiten, um sich zusätzliche Zeit für die DNA-Reparatur zu verschaffen. Im Falle schwerer DNA-Schädigung können aber auch Signaltransduktionswege angeschaltet werden, welche die Apoptose einleiten.

Neben den beschriebenen Möglichkeiten einer DNA-Schädigung wäre ebenso eine Beeinflussung von DNA-Reparaturprozessen durch metallische NP oder durch aus diesen freigesetzten löslichen Metallionen denkbar, wie es durch Hartwig et al. [2002], Kessel et al. [2002] oder Tran et al. [2002] für verschiedene Metalle auf Mikrometerskala festgestellt werden konnte. Weiterhin ist infolge einer möglichen nukleären Translokation von Nanomaterialien eine Interaktion zwischen diesen und nukleären Strukturen wie z.B. DNA-Reparaturenzymen, Histonen oder Topoisomerasen in

Betracht zu ziehen. Eine solche Interaktion von NP und nukleären Bestandteilen konnte für SiO₂-NP in einer Studie von Chen und von Mikecz [2006] gezeigt werden. Nach Translokation dieser NP in den Zellkern konnte die Bildung von Aggregaten zwischen den Partikeln und nukleären Substrukturen, darunter Bestandteilen des Ubiquitin-Proteasom Systems, der Topoisomerasen oder Histonen beobachtet werden, womit wichtige Prozesse wie u.a. Transkription, Replikation oder die „Qualitätssicherung“ von Proteinen gestört werden können.

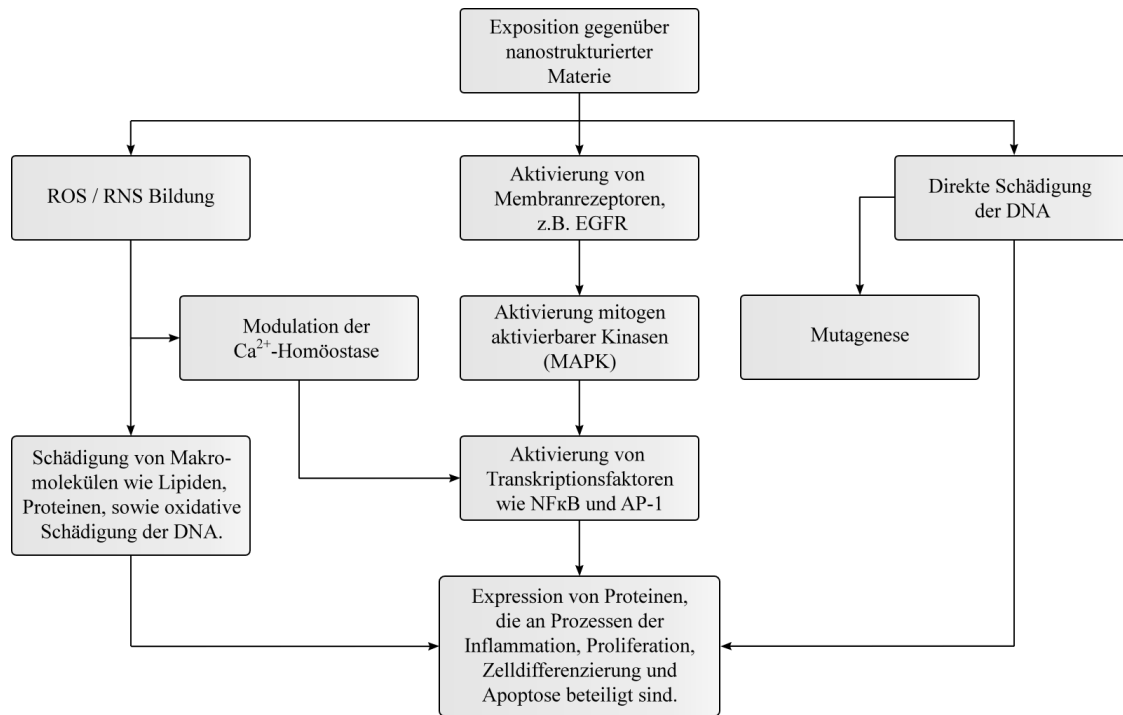


Abbildung 2.8: Übersicht über mögliche biologische Wirkungen von Nanomaterialien, modifiziert nach Mühlfeld et al. [2008]

Eine zusammenfassende Darstellung der beschriebenen biologischen Wirkungen nanostrukturierter Materie ist in Abb. 2.8 zu sehen.

Aufgrund der Heterogenität der Stoffklasse der Nanomaterialien und der Vielfalt an experimentellen Systemen lassen sich keine allgemeingültigen Wirkprinzipien nanostrukturierter Materie darstellen. Die in diesem Forschungsbereich durchgeführten Studien zeigen unterschiedliche und überdies zum Teil kontroverse Ergebnisse. Auch lässt sich das toxikologische Potential nanostrukturierter Materie nicht ursächlich auf die Generierung reaktiver Spezies zurückführen. Vielmehr existieren Studien, welche Nanomaterialien als Radikalfänger beschreiben und ihre antioxidative Wirkung herausstellen [Onizawa et al., 2009; Watanabe et al., 2009; Zhang et al., 2010].

Zukünftig gilt es umfassende wirkmechanistische Studien durchzuführen, welche insbesondere wirkungsbestimmende physikalisch-chemische Eigenschaften der einzelnen Nanomaterialien in den Vordergrund stellen und dadurch einen tieferen Einblick in die komplexen Zusammenhänge biologischer Wirkungen nanostrukturierter Materie und die Aufstellung einer „Eigenschaften-Wirkungs-Beziehung“ erlauben.

2.5.5 Wirkungsbestimmende Eigenschaften nanostrukturierter Materie

Bei den experimentellen Untersuchungen zum toxikologischen Potential nanostrukturierter Materie spielen die jeweiligen physikalisch-chemischen Eigenschaften eine tragende Rolle. Aus der Tatsache, dass sich die Wirkungen von Materialien mit deren Verkleinerung in den Nanometerbereich verändern können, ergibt sich die Frage, welche Charakteristika erstrangig mit der Wirkung korrelieren. Folgende Größen kommen hierbei in Frage: Partikeldurchmesser bzw. -masse, spezifische Partikeloberfläche, Partikelanzahl und Partikelvolumen.

In einer Studie von Pauluhn [2009] konnte gezeigt werden, dass der Durchmesser von Nanoobjekten im Hinblick auf ihre biologischen Wirkungen von Bedeutung ist. In experimentellen Inhalations-Studien an Ratten mit polydispersen, agglomerierten Mikropartikeln ($\varnothing$ 1,7 und 0,6 μm) bestehend aus primären NP ($\varnothing$ 10 - 40 nm) korrelierte die Auslösung entzündlicher Reaktionen besser mit der Massenkonzentration der agglomerierten als mit der Anzahl der primären Partikel. Hiernach wurden die toxischen Effekte vornehmlich durch die agglomerierten Partikel bestimmt. In einer Studie von Müller et al. [2008] wurde jedoch nach Partikel-Agglomeration aufgrund einer dadurch bedingten Abnahme der effektiven Oberfläche ein geringeres toxisches Potential im Vergleich zu Primärpartikeln beobachtet, was vornehmlich die Partikeloberfläche als angemessenes Dosismaß in den Vordergrund stellt.

Auch Oberdörster et al. [2005a] zeigten in einer Studie, bei der der prozentuale Anstieg neutrophiler Granulozyten als proinflammatorischer Indikator nach Inhalation von 20 und 250 nm großen TiO_2 -Partikeln gemessen wurde (siehe Abb. 2.9), dass die Partikeloberfläche im Vergleich

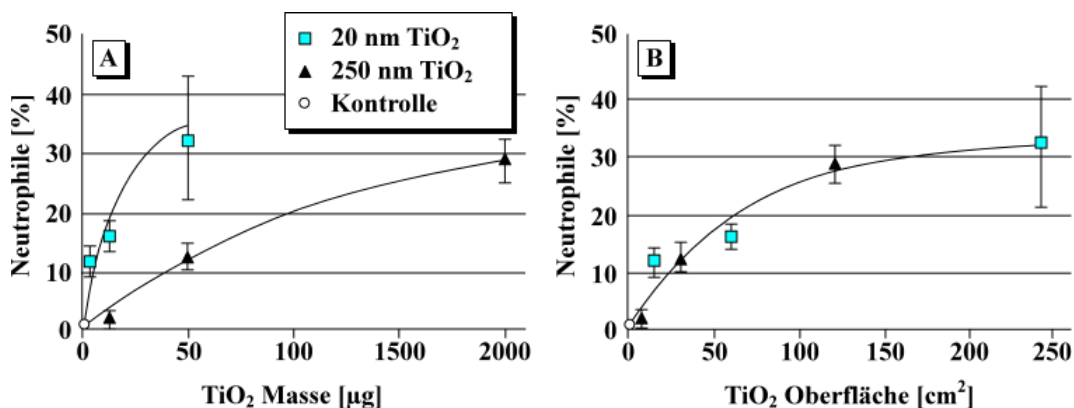


Abbildung 2.9: Prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten in der Lungenlavage von Ratten als proinflammatorischer Indikator, 24 h nach Instillation verschiedener Mengen an TiO_2 -Partikeln der Größe 20 nm und 250 nm. A) Auftragung gegen die Masse B) Auftragung gegen die effektive Oberfläche [Oberdörster et al., 2005a].

zur Masse die geeignetere dosimetrische Größe zur Beschreibung toxischer Effekte darstellt. Eine Korrelation des Anstiegs neutrophiler Granulozyten mit der Partikelmasse zeigte ein höheres toxisches Potential von TiO_2 -Partikeln eines geringeren Durchmessers bei identischer Gesamtmasse. Durch die Wahl der Partikeloberfläche als Bezugsgröße des toxischen Potentials, wurde durch beide Partikelgrößen hingegen eine vergleichbare Dosis-Wirkungs-Kurve beschrieben.

Weiterhin stellte sich in Untersuchungen zu Dosis-Wirkungsbeziehungen an Mäusen mit unterschiedlichen Kohlenstoff-NP (Partikelgröße: 10 - 50 nm; Oberfläche: 30 - 800 m²/g) von Stöger et al. [2007] die Partikeloberfläche als das geeignetste Dosismaß heraus. In vergleichenden Studien zur Eignung der Masse, Oberfläche und Anzahl von NP von Oberdörster et al. [2007] erwies sich die Anzahl-Konzentration dagegen als ungeeignet zur Charakterisierung der Wirkung nanostrukturierter Materie. Weiterhin konnte in einem Forschungsprojekt der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin [Roller, 2008] die Bedeutung des Partikelvolumens in Verbindung mit dem Partikeldurchmesser als Dosismaß herausgestellt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Wahl der entsprechenden Größe zur Beschreibung des toxischen Potentials von Nanomaterialien maßgeblich von der jeweiligen Fragestellung bestimmt wird. Verdeutlicht wird die Komplexität der Frage nach einem angemessenen Dosisparameter dadurch, dass neben Partikeloberfläche, -anzahl und -volumen auch die Oberflächenladung, -beschichtung, und -kristallinität wirkungsbestimmend sind und in derartige Überlegungen eingehen sollten.

2.6 Zellulärer Redoxstatus

Der Redoxstatus einer Zelle bezeichnet das Verhältnis zwischen Oxidantien, wie z.B. RS, oder auch Elektrophilen und der Kapazität entsprechender Verteidigungssysteme. Die Zelle besitzt eine ausbalancierte Redox-Kapazität und befindet sich damit in einem stabilen Zustand, wenn die Rate potentiell schädigender Spezies und die Kapazität vorhandener Abwehrmechanismen im Gleichgewicht sind [Simkó et al., 2009]. Durch oxidativen oder elektrophilen Stress kann dieses Gleichgewicht derart verschoben werden, dass unerwünschte Folgen für die Zelle, wie strukturelle Veränderungen von Proteinen, Lipiden oder der DNA, resultieren können. Dabei bezeichnet der Begriff „oxidativer Stress“ eine Verschiebung der oxidativen/antioxidativen Balance der Zelle zugunsten der Oxidantien infolge einer vermehrten Bildung von RS bzw. einer Verringerung der antioxidativen Abwehr. „Elektrophiler Stress“ dagegen basiert auf der Modulation antioxidativer Mechanismen durch elektrophile Verbindungen wie Epoxide, die im Zuge einer toxisierenden Biotransformation entstehen können.

Wie bereits in Abschnitt 2.5.4.1 erläutert, werden biologische Wirkungen nanostrukturierter Materie vornehmlich in Zusammenhang mit der Induktion von oxidativem Stress diskutiert [Donaldson et al., 2006; Krug et al., 2006; Oberdörster et al., 2005a; Unfried et al., 2007]. Aus diesem Grund wird nachfolgend insbesondere auf die Generierung von RS sowie die zellulären, antioxidativen Verteidigungsmechanismen im Detail eingegangen. Dabei wird besonderes Augenmerk auf das zelluläre Antioxidans Glutathion sowie die redox-sensitive Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“ (Nrf2) gelegt.

2.6.1 Generierung reaktiver Spezies

Wie bereits in Abschnitt 2.5.4.1 beschrieben, können NP infolge ihrer erhöhten Oberflächenreaktivität oder aufgrund metallischer Verunreinigungen sowie durch Interaktion mit subzellulären Strukturen, welche in komplexe biologische Redoxprozesse eingebunden sind, den zellulären Gehalt an RS über das physiologische Maß hinaus erhöhen. Überdies wird diese biologische Eigenschaft als wesentliche Quelle ihres toxischen Potentials diskutiert [Donaldson et al., 2005; Mühlfeld et al., 2008; Oberdörster et al., 2007; Unfried et al., 2007]. Aus diesem Grund soll nachfolgend auf einzelne RS-Formen und deren Bildung im Detail eingegangen werden.

Zu den RS sind reaktive Sauerstoff (ROS)- und Stickstoffspezies (RNS) zu zählen. Diese werden jeweils in radikalische sowie nicht-radikalische Formen unterteilt. Eine Übersicht über die wichtigsten Vertreter ist in Tab. 2.2 gegeben. Daneben existieren reaktive Chlorspezies (RClS) und

Tabelle 2.2: Übersicht über reaktive Sauerstoff (ROS)- und Stickstoffspezies (RNS), sowohl in radikalischer als auch in nicht-radikalischer Form [Halliwell, 2006].

	ROS	RNS
radikalisch	Superoxidanionradikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$) Hydroxylradikale ($\text{OH}^\bullet$) Peroxylradikale ($\text{RO}_2^\bullet$) Alkoxyradikale ($\text{RO}^\bullet$)	Stickstoffmonoxidradikale ($\text{NO}^\bullet$) Stickstoffdioxidradikale ($\text{NO}_2^\bullet$)
nicht-radikalisch	Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Organische Peroxide (ROOH) Ozon (O_3) Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)	Peroxynitrit (ONOO^-) Salpetrige Säure (HNO_2) Distickstofftrioxid (N_2O_3)

reaktive Bromspezies (RBrS) [Halliwell, 2006] auf dies hier nicht näher eingegangen wird.

ROS stellen die wichtigste und bekannteste Form von RS dar [Liochev und Fridovich, 1994]. Die Bildung von ROS erfolgt ausgehend vom molekularen Sauerstoff (O_2), der in physiologischen Flüssigkeiten in höheren mikromolaren Konzentrationen vorhanden ist. Aufgrund der Elektronenkonfiguration dieses diatomischen Moleküls ist der im Grundzustand als Triplett vorliegende Sauerstoff nur mäßig reaktiv, kann aber auf unterschiedliche Art aktiviert werden. Eine Möglichkeit ist die Energiezufuhr durch Licht in Anwesenheit eines Sensibilisators unter Entstehung von $^1\text{O}_2$. Eine weitere Möglichkeit stellt die Reduktion molekularen O_2 unter Entstehung von ROS wie z.B. $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 oder $\text{OH}^\bullet$ dar. Das $\text{O}_2^{\bullet-}$ entsteht u.a. bei der Übertragung von einem Elektron (e^-) auf O_2 (siehe Gleichung 2.1), bspw. durch „Elektronenleaks“ während der oxidativen Phosphorylierung durch die Enzyme der Atmungskette [Murphy, 2009], durch die Xanthin- oder NADPH-Oxidase oder auch im Rahmen des sog. Redox-Cycling [Klotz, 2002; Unfried et

al., 2007].



Beim Redox-Cycling katalysieren Enzyme des Fremdstoffmetabolismus (z. B. Peroxidasen, Cytochrom P-450-Reduktasen) Einelektronenübertragungen, so dass radikalische Metabolite gebildet werden, die ihr freies Elektron dann auf molekularen O_2 übertragen können. Der oxidierte Metabolit kann nun erneut reduziert werden und zur weiteren Bildung von ROS beitragen. Redox-Cycling tritt vor allem bei Verbindungen auf, die eine Chinonstruktur enthalten. In Abb. 2.10 ist Redox-Cycling am Beispiel von Menadion (2-Methylnaphthochinon) dargestellt. Menadion gehört zur Vitamin K-Gruppe und wird als „Redoxcyclere“ in biologischen Systemen zur Generierung von ROS eingesetzt [Eisenbrand et al., 2005].

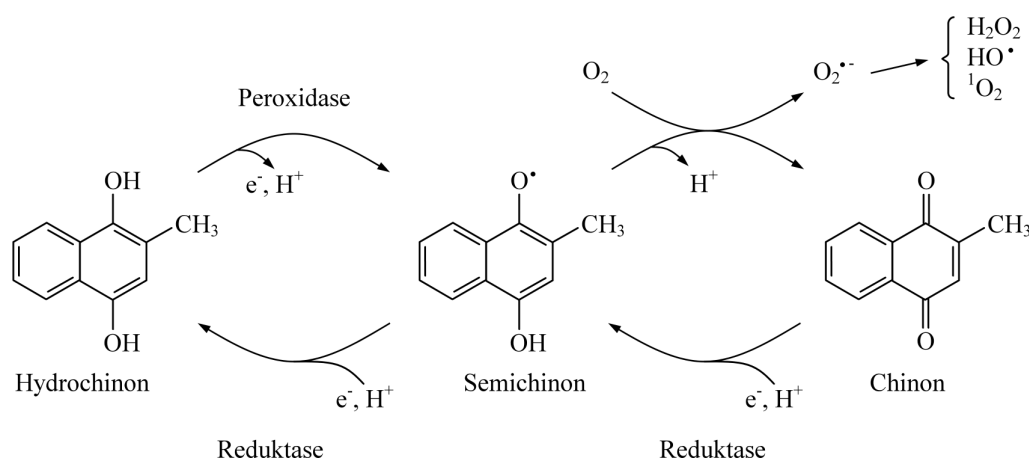


Abbildung 2.10: Redox-Cycling von Menadion (2-Methylnaphthochinon) nach Eisenbrand et al. [2005].

Das amphotere $\text{O}_2^{\bullet-}$ dismutiert spontan oder mithilfe des Enzyms Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 . Dabei reagieren zwei $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Moleküle zu einem H_2O_2 - und einem O_2 -Molekül (siehe Gleichung 2.2).



SOD beschleunigt hierbei die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Faktor von 10^6 und schützt die Zelle vor den Folgen einer zu hohen $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Konzentration, die, insbesondere im Zusammenspiel mit Eisen, zur Beeinträchtigung der Struktur und Funktion verschiedener Biomoleküle führen kann [Gray und Carmichael, 1992].

H_2O_2 besitzt bezüglich seiner oxidierenden bzw. reduzierenden Eigenschaften eine geringe Aktivität. Zudem besitzt die Zelle die Möglichkeit, H_2O_2 mithilfe von Peroxidasen (z.B. Glutathionperoxidase) oder Hämperoxidasen (z. B. Katalase) durch dessen Reduktion zu Wasser zu entgiften. Das Enzym Katalase benötigt hierfür als Wasserstoffdonor ein zweites H_2O_2 -Molekül (siehe Gleichung 2.3), während die Glutathionperoxidase den Wasserstoff aus dem Tripeptid Glutathion (GSH) bezieht (siehe Gleichung 2.4) [Marquardt und Schäfer, 2004].





In Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie Kupfer und Eisen ist H_2O_2 allerdings von hoher toxikologischer Relevanz, da es im Zuge der Fenton-Reaktion in das hochreaktive $\text{OH}^\bullet$ zerfallen kann (siehe Gleichung 2.5).



Mit einem relativ hohen Oxidationspotential von etwa + 2,0 V reagiert $\text{OH}^\bullet$ am Ort seiner Entstehung („site specific“) weiter [Schrader, 2007]. Wird das bei der Fenton-Reaktion oxidierte Metallion in Anwesenheit von $\text{O}_2^{\bullet-}$ reduziert, entsteht ein Reaktionszyklus resultierend in einer verstärkten Schädigung zellulärer Strukturen [Symons und Gutteridge, 1998].

Die oben beschriebenen Reaktionen zur Generierung von ROS können bei der Interaktion von NP mit Zellen auftreten [Unfried et al., 2007]. Zum einen können NP an sich ROS generieren, u. a. in Form von Photosensibilisatoren, was für TiO_2 oder auch für Fullerene gezeigt wurde. Nach Bestrahlung konnte sowohl $^1\text{O}_2$, als auch $\text{O}_2^{\bullet-}$ nachgewiesen werden [Konaka et al., 1999; Yamakoshi et al., 2003]. Dieser Aspekt ist jedoch für die meisten Zellen eines Organismus von geringer Bedeutung, da sie keinem Licht ausgesetzt sind. Weiterhin sind organische Verbindungen aus der Umwelt (z. B. Chinone), die an der aktiven Oberfläche von NP haften bleiben, in der Lage, ROS durch Redox-Cycling zu erzeugen [Xia et al., 2004; Unfried et al., 2007]. Auch Reaktionen vom Fenton-Typ sind bei metallischen NP bzw. NP mit metallhaltigen Verunreinigungen möglich [Unfried et al., 2007]. Ein Überblick über mögliche Wege zur ROS-Bildung durch NP ist in Abb. 2.11 gegeben.

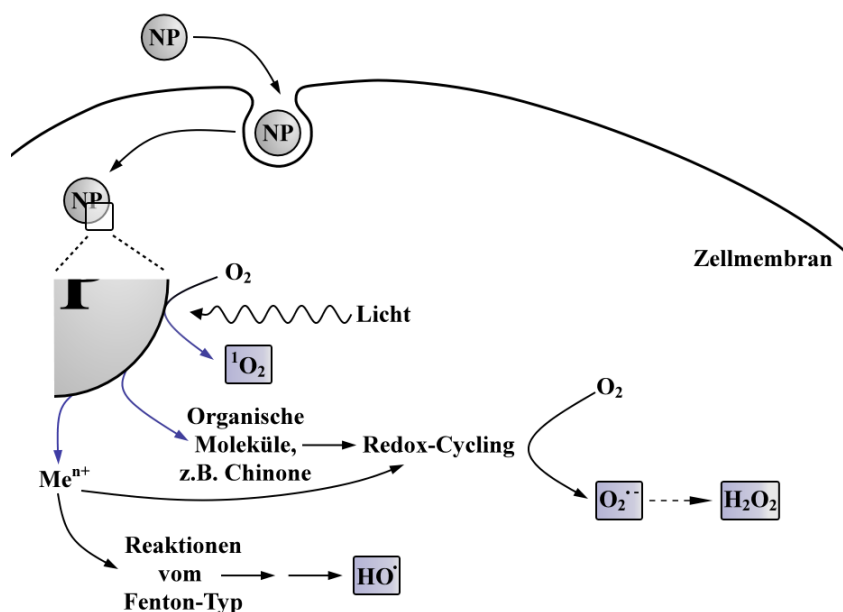


Abbildung 2.11: ROS-Bildung durch NP, modifiziert nach Unfried et al. [2007].

Darüber hinaus ist eine Interaktion von NP mit subzellulären Strukturen, die die Entstehung von ROS beeinflussen, möglich. Zu diesen Strukturen gehören Makrophagen, Mitochondrien so-

wie das endoplasmatische Retikulum (ER) und Enzymkomplexe der Plasmamembran wie die NADPH-Oxidasen (siehe Abschnitt 2.5.4.1).

Eine aufgrund einer „Unverdaulichkeit“ von NP durch Makrophagen ausgelöste permanente phagozytotische Aktivität dieser Zellen kann eine dauerhafte ROS-Überproduktion hervorrufen und somit chronische Entzündungsreaktionen einleiten [Simkó et al., 2009]. Mitochondrien als Quelle von ROS in Verbindung mit der Exposition gegenüber nanostrukturierter Materie wurden bereits in Abschnitt 2.5.4.1 beschrieben.

Daneben stellen Mitochondrien sowie das ER die beiden wichtigsten Speicherkompartimente für Ca^{2+} dar, weshalb eine Interaktion von NP mit diesen zur Ca^{2+} -Freisetzung führen kann [Xia et al., 2006]. Daraus folgend können Calmodulinabhängige Enzyme wie z. B. die Stickstoff-Monooxygenase aktiviert werden, was zur Bildung von Stickstoffmonoxidradikalen ($\text{NO}^\bullet$) führt. $\text{NO}^\bullet$ wiederum ist in der Lage mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ zum stark oxidierenden und nitrierenden Peroxynitrit (ONOO^-) zu reagieren (siehe Gleichung 2.6) [Klotz, 2002; Unfried et al., 2007].



Eine Übersicht über mögliche Interaktionen von NP mit subzellulären Strukturen und den daraus entstehenden reaktiven Spezies ist in Abb. 2.12 gezeigt.

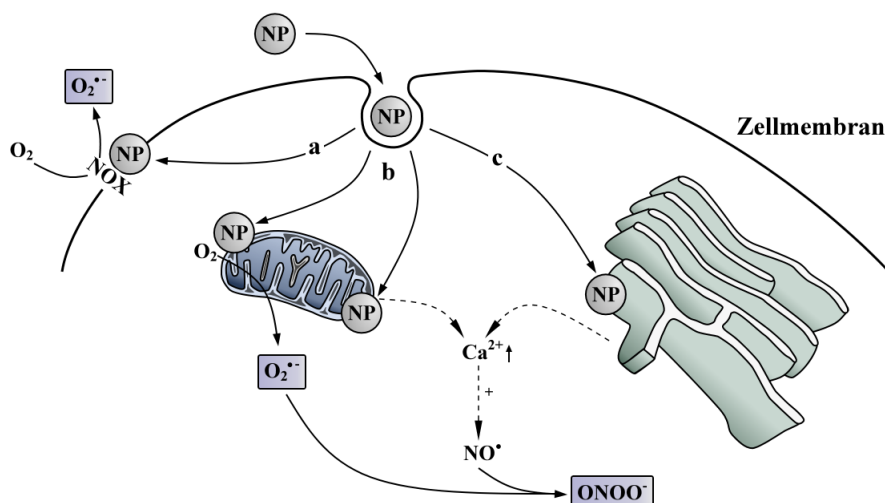


Abbildung 2.12: Wechselwirkungen von NP mit subzellulären Strukturen wie NADPH-Oxidasen (NOX) (a), Mitochondrien (b) und dem Endoplasmatischen Retikulum (c) als Quelle von RS, modifiziert nach Unfried et al. [2007].

Freie Radikale sowie reaktive Nichtradikale sind zu einem gewissen Maß in lebenden aeroben Systemen immer vorhanden und erfüllen in diesen physiologischen Konzentrationen eine Reihe wichtiger Funktionen. So spielen freie Radikale vermutlich über die Vermittlung der Apoptose eine Rolle in der körpereigenen Tumorsuppression. In immunrelevanten Zellen wird das reaktive Potential von ROS auch als zellulärer Abwehrmechanismus bei eindringenden Pathogenen für die Abtötung von Bakterien, Viren und entarteten Zellen genutzt. Ferner erfüllen Radikale wichtige physiologische Funktionen, wie die Regulation des vaskulären Tonus, die Beeinflussung von Si-

gnalübertragungsmechanismen und schließlich die Auslösung oxidativer Stressantworten [Simkó et al., 2009].

Eine steigende, das physiologische Maß überschreitende RS-Konzentration kann hingegen sog. oxidative Bedingungen bzw. Prozesse auslösen und damit direkte Schädigungen an Biomolekülen bewirken. In diesem Zusammenhang ist eine mögliche Lipidperoxidation zu nennen, welche zum Verlust der Membranintegrität führen kann [Halliwell, 2006]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Modifikation von Proteinstrukturen, wodurch die Funktion und Aktivität von Proteinen, die an der zellulären Signalantwort und der Genexpression beteiligt sind, Enzymen des Fremdstoffmetabolismus und der DNA-Reparatur sowie Strukturproteinen stark eingeschränkt werden kann [Marnett et al., 2003]. Weiterhin hat sich gezeigt, dass steigende zelluläre RS-Konzentrationen in die Schädigung des Genoms infolge oxidativer Modifikation von DNA-Basen, Desoxyriboseresten oder des Phosphodiesterückgrats sowie die Aktivierung redox-sensitiver Signalwege (siehe Abschnitt 2.5.4.2) involviert sind. Zudem ist es denkbar, dass die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran durch Interaktion mit NP beeinflusst wird, was zu einer Freisetzung von Cytochrom C und nachfolgender Aktivierung pro-apoptotischer Signalkaskaden führen kann [Unfried et al., 2007]. Zusätzlich ist ein ROS-bedingtes Absinken des intrazellulären GSH-Spiegels möglich, wodurch die antioxidative Kapazität der Zelle sinkt und somit die Wahrscheinlichkeit der Zellschädigung durch weitere Elektrophile zunimmt.

Aufgrund dieser Vielfalt an möglichen Interaktionen von RS mit zellulären Strukturen werden diese direkt oder indirekt mit der Entstehung degenerativer Krankheiten in Verbindung gebracht. Hierzu zählen nicht nur Krebs [Halliwell, 2002] und koronare Herzkrankheit, sondern auch degenerative neurologische Krankheiten wie die Alzheimer'sche Krankheit und Parkinsonismus [Sayre et al., 2008], Autoimmunerkrankungen einschließlich rheumatoider Arthritis und altersbedingter Makuladegeneration.

2.6.2 Antioxidative Mechanismen der Zelle

Um intrazellulären Schädigungen durch RS entgegen zu wirken bzw. eine ausbalancierte Redox-Kapazität der Zelle aufrecht zu erhalten, haben alle Organismen verschiedene Verteidigungssysteme entwickelt. Diese ausgleichend wirkende Redoxregulation der Zelle wird als Redox-Homöostase bezeichnet [Simkó et al., 2009].

Die homöostatische Aktivität der Zelle beruht sowohl auf einem enzymatischen Abbau von RS als auch auf der antioxidativen Wirkung nicht-enzymatischer niedermolekularer Verbindungen. In diesem Zusammenhang kommt insbesondere dem zellulären Antioxidans Glutathion eine große Bedeutung zu. Daneben besteht für die Zelle die Möglichkeit einer Minimierung der Verfügbarkeit von Prooxidantien wie dem zweiwertigen Eisen, Häm oder einwertigen Kupfer durch spezielle Proteine.

2.6.2.1 Antioxidativ wirkende Enzyme

Wie bereits in Abschnitt 2.6.1 kurz beschrieben, stellen intrazelluläre Enzyme wie die SOD, Glutathionperoxidase (GPx) oder Katalase das Rückgrat antioxidativer Verteidigungssysteme der Zelle dar.

SODs kommen in nahezu allen Organismen vor und werden nach den im aktiven Zentrum präsenten Metallionen unterschieden. Während Kupfer-Zink-SODs (CuZnSOD) hauptsächlich in Prokaryoten zu finden und im Zytosol lokalisiert sind, werden manganhaltige SODs (MnSODs) in Peroxisomen und Mitochondrien vorgefunden. Das Prinzip der Katalyse der Dismutation von $\text{O}_2^{\bullet-}$ ist dabei bei allen SOD-Gruppen vergleichbar. Im ersten Schritt wird ein e^- von $\text{O}_2^{\bullet-}$ auf das katalytisch-aktive Metallion (Kupfer oder Mangan) übertragen, wobei dieses reduziert wird und sich molekularer Sauerstoff bildet. Im zweiten Schritt wird das e^- in Anwesenheit von H^+ auf ein zweites Molekül $\text{O}_2^{\bullet-}$ übertragen, wobei das Metallion wieder oxidiert und ein Molekül H_2O_2 gebildet wird. Daraus ergibt sich die bereits aufgeführte Gesamtgleichung (siehe Gleichung 2.2). Zur Detoxifizierung des aus $\text{O}_2^{\bullet-}$ gebildeten H_2O_2 stehen der Zelle verschiedene Peroxidasen zur Verfügung: Häm-enthaltende Katalase-Peroxidasen und GPx.

Katalasen sind in Eukaryoten nahezu ausschließlich in den Peroxisomen lokalisiert. Sie bestehen aus vier identischen Proteinuntereinheiten, die jeweils mit einer Häm-Gruppe im aktiven Zentrum und einer NADPH-Bindestelle versehen sind. In einem komplexen Reaktionsmechanismus katalysiert diese Enzymgruppe direkt die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Bezüglich des Reaktionsmechanismus wird auf weiterführende Literatur verwiesen [Elstner, 1990; Halliwell und Gutteridge, 1999]. GPx dagegen bewirken den Abbau von H_2O_2 indem sie e^- von GSH als Kofaktor übertragen, wobei GSH zu GSSG oxidiert wird. Diese Enzymgruppe ist sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien lokalisiert und katalysiert neben der Reduktion von H_2O_2 auch die Beseitigung bestimmter Lipidperoxide (siehe Gleichung 2.8).



GPx bestehen ebenfalls aus vier Proteinuntereinheiten, die im aktiven Zentrum jeweils ein Selenocystein enthalten. Der Mechanismus der GPx-katalysierten Reduktion von Peroxiden stellt sich wie folgt dar: Im ersten Schritt reduziert ein Selenol-Anion ein Peroxid-Molekül zum korrespondierenden Alkohol und wird dabei zur selenischen Säure (SeOH) oxidiert (1). Die folgenden zwei Schritte (2) und (3) bestehen aus der sequentiellen Reduktion der selenischen Säure durch GSH, wobei zuerst ein Selenosulfid und Wasser gebildet (2) und anschließend das Selenol regeneriert und dabei GSH unter Bildung von GSSG oxidiert wird (3) [Nelson und Cox, 2001].

- (1) $E - \text{Cys} - \text{Se}^- + \text{ROOH} + \text{H}^+ \rightarrow E - \text{Cys} - \text{SeOH} + \text{ROH}$
- (2) $E - \text{Cys} - \text{SeOH} + \text{GSH} \rightarrow E - \text{Cys} - \text{SeOH} - \text{GSH} \rightarrow E - \text{Cys} - \text{Se} - \text{SG} + \text{H}_2\text{O}$
- (3) $E - \text{Cys} - \text{Se} - \text{SG} + \text{GSH} \rightarrow E - \text{Cys} - \text{Se} - \text{SG} - \text{GSH} \rightarrow E - \text{Cys} - \text{SeH} - \text{GSSG}$
 $\rightarrow E - \text{Cys} - \text{Se}^- + \text{H}^+ + \text{GSSG}$

2.6.2.2 Glutathion

Neben seiner Funktion als Kofaktor der GPx ist Glutathion (GSH) als zelluläres Antioxidans direkt in die Detoxifizierung potentiell schädlicher Spezies, wie RS oder Elektrophilen aber auch in weitere physiologische Prozesse involviert [Forman et al., 2009] und gilt daher als der wichtigste Redox-Puffer der Säugetierzelle [Filomeni et al., 2002]. Aus diesem Grund sollen nachfolgend dessen Struktur, Synthese und Funktion näher erläutert werden.

GSH ist ein körpereigenes Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin), wobei Cystein und Glutamat über die γ -Carboxylgruppe miteinander verknüpft sind (siehe Abb. 2.13).

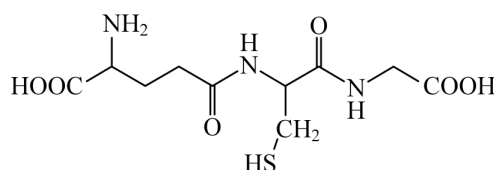


Abbildung 2.13: Strukturformel von Glutathion in der reduzierten Form (GSH).

Die GSH-Synthese findet vorwiegend im Zytosol statt, von wo es in andere Zellkompartimente wie die Mitochondrien oder den Zellkern transportiert wird. Dabei erfolgt die Biosynthese in einem zweistufigen enzymatischen Prozess. Im ersten Schritt wird unter ATP (Adenosintriphosphat)-Verbrauch aus Glutamat und Cystein γ -Glutamylcystein gebildet. Die Bildung der Isopeptidbindung zwischen der γ -Carboxylgruppe des Glutamats und der Aminogruppe des Cysteins wird hierbei durch das Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase, auch als γ -Glutamatcystein-Ligase (γ -GCL) bezeichnet, katalysiert. Nachfolgend wird unter Mitwirkung der Glutathion-Synthetase und unter ATP-Verbrauch Glycin an das terminale Kohlenstoffatom des Cysteins addiert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-Synthese ist die durch die γ -GCL katalysierte Reaktion, da dieses Enzym durch das Endprodukt GSH gehemmt wird. Die GSH-Konzentration bewegt sich in den meisten Zellen in einem Bereich von 1 - 10 mM [Forman et al., 2009], wobei vor allem Leberzellen, Augenlinsen und Erythrozyten höhere Mengen des Tripeptids aufweisen [Nelson und Cox, 2001].

Die schützende Wirkung des GSH basiert vornehmlich auf der freien Thiolgruppe des Cysteins. Aufgrund der Nukleophilie dieser funktionellen Gruppe reagiert GSH leicht mit elektrophilen Verbindungen. Gleichzeitig dient der leicht oxidierbare SH-Rest als H-Donor, wodurch GSH zu einem hochwirksamen Antioxidans wird [Nelson und Cox, 2001].

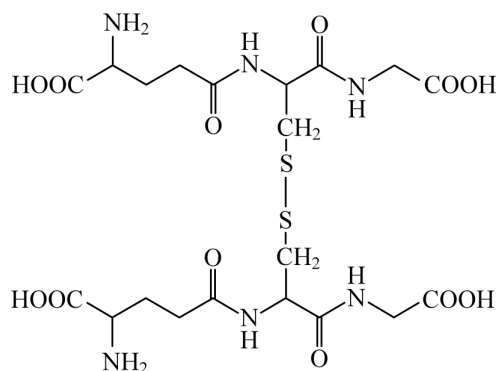


Abbildung 2.14: Strukturformel von Glutathion in der oxidierten Form (GSSG).

So werden durch GSH sowohl in Ein-Elektronen-Reaktionen Radikale abgefangen, wobei Thiyl-Radikale gebildet werden, als auch e^- für Zwei-Elektronen-Reduktionen zur Verfügung gestellt. Dabei wird Glutathion oxidiert und geht von seiner monomeren reduzierten Thiolform (GSH) in die oxidierte Form (GSSG) über, in der zwei Tripeptide über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind (siehe Abb. 2.14).

Der Anteil von GSSG am Gesamtglutathiongehalt von Zellen beträgt unter normalen Bedingungen weniger als 1 %. Zur Aufrechterhaltung des GSH/GSSG-Verhältnisses hat die Zelle, neben der *de novo*-Synthese von GSH, die Möglichkeit der Rückgewinnung der reduzierten Form aus GSSG unter Mitwirkung der Glutathion-Reduktase (GR) [Nelson und Cox, 2001].

Bei der GR handelt es sich um ein Dimer, dessen Monomere jeweils vier Domänen mit unterschiedlichen Funktionen enthalten. Eine Domäne bindet FAD, eine NADPH, die dritte stellt die zentrale Domäne dar. Die vierte Domäne bildet einen Teil der Bindungsstelle für GSSG und ist zudem für die kovalente Fixierung der dimeren Struktur durch Bildung einer Disulfidbrücke mit der anderen Untereinheit verantwortlich [Schulz et al., 1978]. Dabei haben alle vier Domänen Anteil am Aufbau des aktiven Zentrums und sind somit essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms. Die Reduktion von GSSG zu GSH verläuft in einer zweistufigen katalytischen Reaktion. Im ersten Schritt des Katalysezyklus wird unter Mitwirkung von NADPH und FAD die Disulfidbrücke der GR gespalten, wobei sich zwei Thiolgruppen ausbilden. Im zweiten Schritt bindet GSSG an das reduzierte Enzym und wird schließlich durch eine nukleophile Disulfidaustauschreaktion zu zwei GSH reduziert, während die GR wieder in ihren oxidierten Zustand überführt wird (Gleichung 2.8) [Nelson und Cox, 2001].



Neben seiner bedeutenden Rolle im antioxidativen Schutzsystem und der bereits in Abschnitt 2.6.2.1 erläuterten Beteiligung als Kofaktor der GPx zur Entgiftung gebildeter Peroxide, spielt GSH in einer Vielzahl verschiedener Stoffwechselprozesse eine entscheidende Rolle [Forman et al., 2009]. So trägt GSH zu einem wesentlichen Teil zu intrazellulären Entgiftungsprozessen bei, indem es bereits nicht-enzymatisch aber auch unter Mitwirkung von GSH-S-Transferasen (GST)

mit potentiell schädlichen Elektrophilen reagiert. Zudem ist GSH essentiell für den Eintritt von Zellen in den Zellzyklus und dessen Ablauf [Poot et al., 1995] und scheint in die Regulation der Apoptose und Zellteilung involviert zu sein [Hall, 1999; Pallardó et al., 2009]. Darüber hinaus schützt es die Tertiärstruktur von Proteinen, fördert den Transport von Aminosäuren durch die Zellmembranen und dient als Speicher- und Transportform von Cystein [Meister und Anderson, 1983; Cooper, 1997]. Selbst die Regenerierung weiterer Antioxidantien wie u.a. Vitamin C und E verläuft unter Beteiligung von GSH.

Ein Absinken des intrazellulären GSH-Spiegels kann demnach nicht nur eine Schädigung zellulärer Makromoleküle (Proteine, DNA, Membranen etc.) durch RS zur Folge haben, sondern zahlreiche Zellfunktionen erheblich beeinträchtigen oder zum Zelltod führen [Berg et al., 2003].

2.6.3 Der Nrf2/ARE-Signalweg

Die in Abschnitt 2.6.2.2 aufgeführten Enzyme GST und γ -GCL zählen zu den sog. Phase-II-Entgiftungsenzymen. Phase-II-Enzyme sind u.a. an der Detoxifizierung von ROS sowie elektrophiler Metabolite beteiligt und sind somit, neben nicht-enzymatischen Antioxidantien und anderen antioxidativ wirkenden Enzymen (siehe Abschnitt 2.6.2.1), Bestandteil des zellulären Abwehrsystems gegenüber oxidativem bzw. elektrophilem Stress. zu den Phase-II-Enzymen zählen weiterhin die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQO1), die GPx, die Hämoxigenase-1 (HO-1) sowie die UDP-Glukuronosyl-Transferasen (UGT) zu nennen. Unter basalen Bedingungen werden diese Enzyme in geringem Maße konstitutiv exprimiert. Ihre Gentranskription kann jedoch durch oxidativen Stress oder sog. ARE (antioxidativ responsives Element)-Aktivatoren induziert werden [Nguyen et al., 2004]. Ein zentraler Faktor bei der Transaktivierung der entsprechenden zytoprotektiven Gene ist der Transkriptionsfaktor „nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2) - related factor 2“ (Nrf2) [Toyokuni und Akatsuka, 2007].

Das Nrf2-Protein Der Transkriptionsfaktor Nrf2 hat eine Molekülmasse von 66,1 kDa und wird ubiquitär in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimiert [Nguyen et al., 2004]. Es ist Mitglied der Familie der basischen „Leucine zipper“ (bZIP) und besitzt ein CNC („cap’n’collar“-Motiv. In seiner inaktiven Form liegt Nrf2 mit dem „Kelch-like ECH-associated protein 1“ (Keap1) und der E3-Ubiquitin-Ligase Cul3 im Komplex vor. Dabei ist der Komplex im Zytoplasma lokalisiert, wobei Keap1 mit dem Aktin des Zytoskeletts assoziiert ist.

Aktivierung und Regulation des Nrf2-Proteins Die Aktivierung von Nrf2 erfolgt durch oxidativen Stress oder sog. ARE-Aktivatoren und führt zu einer Freigabe des Transkriptionsfaktors aus dem Ubiquitinylierungskomplex Keap1/Cul3 sowie zu dessen Translokation in den Zellkern. Im Zellkern bildet Nrf2 als Mitglied der CNC-Familie mit weiteren Transkriptionsfaktoren, welche ebenfalls eine bZIP-Domäne enthalten (Jun, Fos, Fra, Maf), Heterodimere, die in der Folge die Transkription redox-sensitiver Gene induzieren können [Zhang et al., 2004]. Die Aktivierung der Gentranskription erfolgt dabei durch Wechselwirkung mit dem sog. „cis-acting

element“ ARE. Das ARE ist ein 42 bp langer, „upstream“ gelegener funktioneller Sequenzbereich, welcher essentiell für die Expression und Induzierbarkeit der Phase II-Enzyme ist [Friling et al., 1990].

Dem negativen Regulator Keap1 kommen in der Nrf2-Signalübertragung zwei entscheidende Aufgaben zu: Unter stressfreien Bedingungen („homeostatic conditions“) fungiert Keap1 als Bestandteil der E3-Ubiquitin-Ligase und somit als konstitutiver Repressor von Nrf2. E3-Ligasen erkennen das Zielprotein und katalysieren in der Folge seine Konjugation mit Ubiquitin. Eine Unterfamilie der E3-Ligasen sind die Cullin-Proteine (Cul). Wie bereits erwähnt, ist Keap1 mit Cul3 assoziiert. Cul3 ubiquitinyliert die Lysin-Reste spezifischer Domänen von Nrf2 und markiert das Protein somit für den proteasomalen Abbau [Zhang, 2006]. Durch den schnellen „turn-over“ (Abbaurate 15 min) wird somit eine ungewollte Nrf2-Aktivierung verhindert [Nguyen et al., 2003].

Unter Stressbedingungen fungiert Keap1 als Sensor für oxidativen und elektrophilen Stress zu. Dabei sind an der Erkennung eines veränderten zellulären Redoxstatus insbesondere neun der insgesamt 27 Cystein-Reste dieses Proteins aufgrund ihrer durch die Nachbarschaft zu basischen AS erhöhten Reaktivität maßgeblich beteiligt [Kensler et al., 2007].

Im Zusammenhang mit der Aktivierung von Nrf2 konnte zudem gezeigt werden, dass ARE-Aktivatoren die Aktivität der Keap1-E3-Ubiquitin-Ligase Cul3 zu hemmen vermögen, wodurch Nrf2 in geringerem Maß ubiquitinyliert wird und im Zytosol akkumuliert [Zhang, 2006]. Diesbezüglich wird vermutet, dass durch eine von ARE-Aktivatoren ausgelöste posttranslationale Modifikation von Keap1 am Cystein-Rest 151 eine Konformationsänderung bewirkt wird, wodurch sich die Aktivität der Keap1-E3-Ubiquitin-Ligase Cul3 verringert. Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist bislang jedoch unklar [Zhang, 2006].

Weiterhin wird in Studien gezeigt, dass bestimmte ARE-Aktivatoren den Ubiquitin-vermittelten Abbau von Keap1 erhöhen und somit zu einer Aktivierung von Nrf2 führen können [Kensler et al., 2007].

Die Translokation von Nrf2 kann neben der Modifikation von Keap1 und einer damit verbundenen Stabilisierung von Nrf2 auch durch eine Erhöhung des nukleären Imports ausgelöst werden [Huang et al., 2002]. Auch die Beteiligung vorgeschalteter Signalkaskaden (MAPK, Phosphatidylinositol-3-Kinase, PI3K; Protein Kinase C, PKC) an der Aktivierung von Nrf2 konnte gezeigt werden. Dabei werden sowohl Cystein-Modifikationen von Nrf2 als auch eine Phosphorylierung des Proteins in Zusammenhang mit seiner subzellulären Lokalisierung gebracht. Zudem konnte durch Nguyen et al. [2005] gezeigt werden, dass Keap1 sich zwischen Zytoplasma und Kern bewegt und nicht, wie zuvor angenommen, ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist. Folglich besteht die Möglichkeit, dass Nrf2 auch im Komplex mit Keap1 in den Zellkern wandern könnte. Weiterhin wird auch von einem konstitutiven Nrf2-Abbau im Zellkern im Zusammenhang mit der Bildung einer E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion von Keap1 berichtet [Nguyen et al., 2005].

Eine schematische Darstellung der Nrf2-Regulation ist in Abb. 2.15 gegeben.

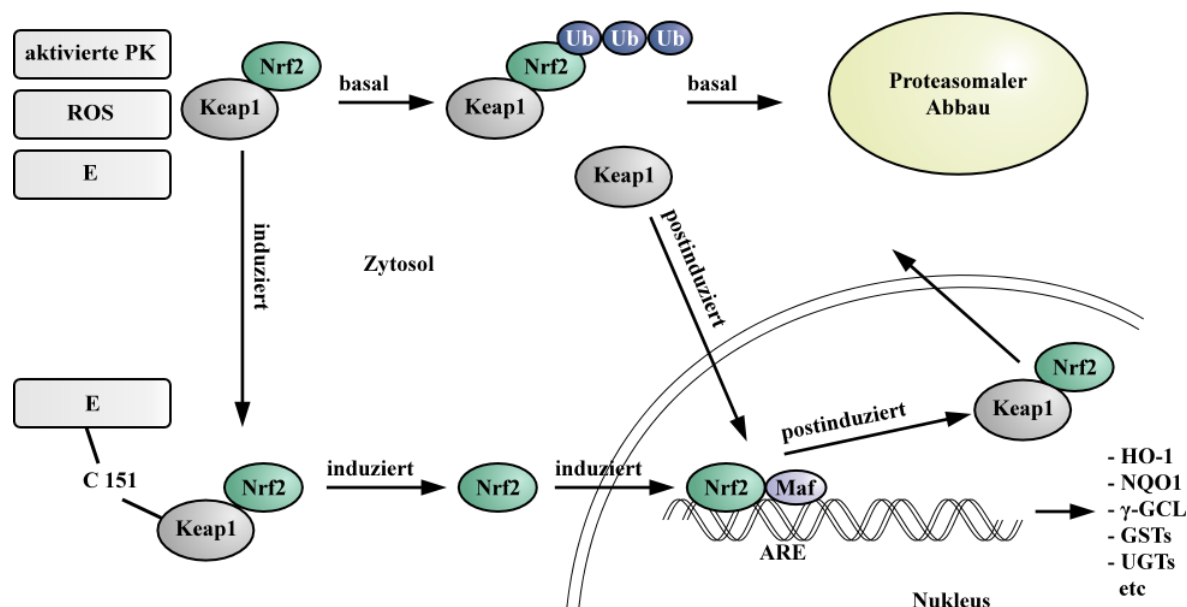


Abbildung 2.15: Schematisches Modell der Nrf2-Regulation durch Keap1. ARE, Antioxidativ responsives Element; E, Elektrophil; GST, Glutathion-*S*-Transferase; Keap1, „Kelch-like ECH associated protein“ 1; Maf, Makrophagen aktivierender Faktor; NQO1, NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase-1; Nrf2, „nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor“ 2; PK, Proteinkinasen; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; Ub, Ubiquitin; UGT, UDP-Glukuronosyltransferasen; γ-GCL, γ-Glutamylcysteinylgase, modifiziert nach Lau et al. [2008].

2.7 Erfassung des genotoxischen Potentials von Testsubstanzen

Nanomaterialien sind in der Lage die DNA-Integrität der Zelle indirekt oder direkt zu beeinflussen (siehe Abschnitt 2.5.4.3). Zur Erfassung des genotoxischen Potentials einer Testsubstanz kann als eine Möglichkeit die Bestimmung DNA-strangbrechender Eigenschaften mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) herangezogen werden. Hierbei wird ein induzierter DNA-Schaden in DNA-Strangbrüche überführt und kann in Form eines sog. Kometenschweif quantitativ erfasst werden (siehe Abschnitt 5.12.1). Durch den Einsatz spezifischer DNA-Reparaturenzyme, aber auch durch ergänzende Genotoxizitäts-Untersuchungen kann die Aussagekraft des Comet Assays verstärkt sowie ein erweitertes Bild über das genotoxische Potential gewonnen werden.

Eine Möglichkeit stellt der Einsatz des DNA-Reparaturenzyms Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) in Genotoxizitäts-Untersuchungen dar, was die zusätzliche Erfassung oxidativer DNA-Schäden oder sog. FPG-sensitiver Stellen erlaubt. Als weiterer Hinweis auf das genotoxische Potential einer Testsubstanz dient die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53, welches als sog. Wächter des Genoms verhindert, dass ein genetischer Schaden an die Tochterzellen weitergegeben wird und sich als Mutation manifestiert [Lane et al., 1992]. Nicht zuletzt kann im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungsansätzen durch die Erfassung einer Mikrokern-Induktion ein bereits manifestierter genetischer Schaden festgestellt werden. Die angeführten Ansatzpunkte sollen nachfolgend näher erläutert werden.

2.7.1 Das DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase

Wie bereits in Abschnitt 2.6 erwähnt, kann ein das physiologische Maß überschreitender ROS-Gehalt der Zelle mit einer oxidativen Schädigung biologischer Makromoleküle, wie der DNA, einhergehen. Zur Erkennung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden verfügt die Zelle über einen sog. Basenexzisionsreparatur (BER)-Mechanismus. Ein wichtiges prokaryotisches (*E. coli*) BER-Enzym stellt FPG dar. FPG ist ein aus 469 Aminosäuren bestehendes Metalloprotein mit einem Molekulargewicht von 30,2 kDa. Das Protein ist insbesondere für die Erkennung und Beseitigung der promutagenen DNA-Läsion 8-Oxo-Guanin (8-OxoG) von Bedeutung [Morland et al., 2002]. Weitere Substrate von FPG sind 8-Oxo-Adenin (8-OxoA) und die aus den oxidierten Purinbasen infolge einer Imidazol-Ringöffnung resultierenden Formamidopyrimidine (FapyA und FapyG) [Chetsanga et al., 1979; Boiteux et al., 1990; 1992] sowie alkylierte Fapy, die durch Ringöffnung aus einem entsprechend instabilen DNA-Addukt gebildet werden (z.B. N⁷-Me-FapyG) [Boiteux et al., 1992; Laval et al., 1991; Li et al., 1997]. Des Weiteren erkennt das Enzym apurine Stellen (AP-Stellen), die durch spontane Depurinierung aus DNA-Addukten entstanden sind [Coste et al., 2004; Boiteux, 1993]. Eine Auswahl an FPG-Substraten ist in Abbildung 2.16 strukturell dargestellt.

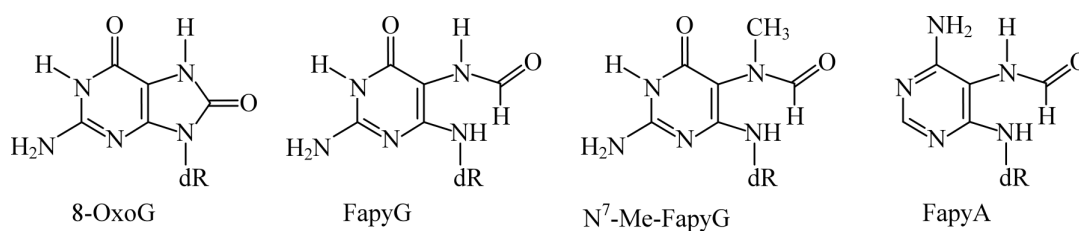


Abbildung 2.16: Substrate der Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase. dR, Desoxyribose; 8-OxoG, 8- Oxo-Guanin; FapyG, Guanotin mit geöffnetem Imidazolring; N⁷-Methyl-FapyG, Guanotin mit geöffnetem Imidazolring und Methylgruppe in N⁷-Position; FapyA, Adenosin mit geöffnetem Imidazolring [Frosina, 2006].

Zur Reparatur vorhandener DNA-Läsionen bindet FPG zunächst an die doppelsträngige DNA. Hierfür sind zwei DNA-bindende Domänen des Enzyms verantwortlich, das im N-terminalen Bereich befindliche *helix-two-turn-helix*-Motiv sowie das im C-Terminus lokalisierte Zinkfingermotiv, in dem das Metall durch vier Cystein-Reste (Cys244, Cys247, Cys264, Cys267) komplexiert wird [Boiteux, 1993; Buchko et al., 2000]. Zudem besitzt FPG als bifunktionelles Enzym zwei katalytische Aktivitäten: Eine DNA-Glykosylase- und eine AP-Lyase-Aktivität [Buchko et al., 2002]. Durch die DNA-Glykosylase-Aktivität des Enzyms wird die spezifisch modifizierte Base erkannt und aus der DNA herausgeschnitten, woraus eine AP-Stelle resultiert. Durch die AP-Lyase-Aktivität erfolgt im Anschluss eine Öffnung des DNA-Rückgrates an der defekten Stelle [Frosina, 2006; Laval, 1996].

Humane Homologe zu FPG sind hFPG1 und hFPG2 [Morland et al., 2002] bzw. hOGG1 (analog zu der mit OGG1 bezeichneten 8-Oxo-Guanin DNA Glykosylase 1 in Mäusen benannt [Smart et al., 2006]).

2.7.2 Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53

Das p53-Protein Der Transkriptionsfaktor p53 ist beim Menschen durch das auf Chromosom 17 (17p13.1) lokalisierte *TP53*-Tumorsuppressorgen codiert [Isobe et al., 1986]. Zusammen mit p63 und p73 bildet es die Familie der sog. p53-Proteine, wobei die beiden Homologe eine zu p53 teilweise redundante Funktion besitzen [D’Erchia et al., 2003; Vilgelm et al., 2010]. Aus der Anzahl seiner Aminosäuren (393 Aminosäuren) errechnet sich für das p53-Protein ein Molekulargewicht von 43,5 kDa. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese läuft p53 jedoch auf der Höhe von 53 kDa. Aus diesem aberranten Laufverhalten, das auf eine Anhäufung von helixbrechenden Prolin-Resten im Aminoterminal und auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist, resultiert seine Bezeichnung als p53 [Oren, 1985].

Regulation und Aktivierung des p53-Proteins Unter physiologischen Bedingungen wird p53 relativ schnell abgebaut. Die Halbwertszeit des Proteins beträgt weniger als 30 min [Kubbutat et al., 1997; Lu et al., 1996]. Dabei tragen verschiedene Mechanismen dazu bei, die Konzentration des p53-Proteins in der Zelle zu regulieren und auf den jeweiligen Bedarf anzupassen. Im Vordergrund steht hierbei der p53-Antagonist Mdm2 („murine double minute chromosome-2“), welcher als E3-Ligase die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von p53 initiiert und somit dessen Transaktivierungskapazität beeinflusst [Momand et al., 2000]. Dabei wird bei geringen Konzentrationen von Mdm2 die Monoubiquitylierung sowie der Kernexport von p53 induziert, während das Protein bei hohen Mdm2-Konzentrationen polyubiquityliert und dem proteasomalen Abbau zugeführt wird [Li et al., 2003]. Die Transkription von Mdm2 wiederum wird durch p53 kontrolliert. Durch diese autoregulatorische Rückkopplungsschleife („negative feedback loop“) wird die Konzentration beider Proteine in der Zelle streng reguliert. Zudem existieren negative Regulatoren von Mdm2 wie die Proteinkinase ATM („ataxia telangiectasia mutated“) oder der Tumorsuppressor ARF („alternative reading frame“), welche dessen Konzentration und Funktion in der Zelle beeinflussen [Weber et al., 1999]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die Regulation der p53-Konzentration auch auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet und murines p53 in ungestressten Zellen an seine eigene mRNA bindet und die Translation inhibiert [Mosner et al., 1995].

Infolge zellulären Stresses wie Hypoxie, Virusinfektionen, Aktivierung von Onkogenen oder DNA-Schädigung wird p53 durch posttranslationale Modifizierung, wie Phosphorylierung oder Acetylierung, stabilisiert und aktiviert. Wichtige Signaltransduktionswege, die infolge von DNA-Schäden zu einer Phosphorylierung beitragen, werden von den Proteinkinasen ATM und ATR (ATM- und Rad3 verwandte Proteinkinase) vermittelt. Nach ihrer Induktion aufgrund einer DNA-Schädigung aktivieren ATM und ATR die Checkpoint-Kinasen Chk2 und Chk1, die ihrerseits p53 an spezifischen Serinresten phosphorylieren. Daneben kann p53 durch ATM und ATR direkt phosphoryliert werden. Diese Modifizierungen führen zu einer Schwächung der p53/Mdm2-Bindung wodurch die Degradation von p53 vermindert wird. Daraus resultiert eine erhöhte Halbwertszeit [Liu et al., 1994; Muralidhar et al., 1996] und eine Akkumulation des Proteins im Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor durch Wechselwirkung mit dem sog. „p53 responsiven

Element" spezifische Zielgene transaktiviert. Dabei liegt DNA bindendes, transkriptionell aktives p53 im tetrameren Zustand vor, wobei sich das Tetramer aus zwei identischen p53-Dimeren zusammensetzt [Clare et al., 1995; Jeffrey et al., 1995]. Die Regulation und Aktivierung des p53-Proteins ist in Abb. 2.17 in vereinfachter Form veranschaulicht.

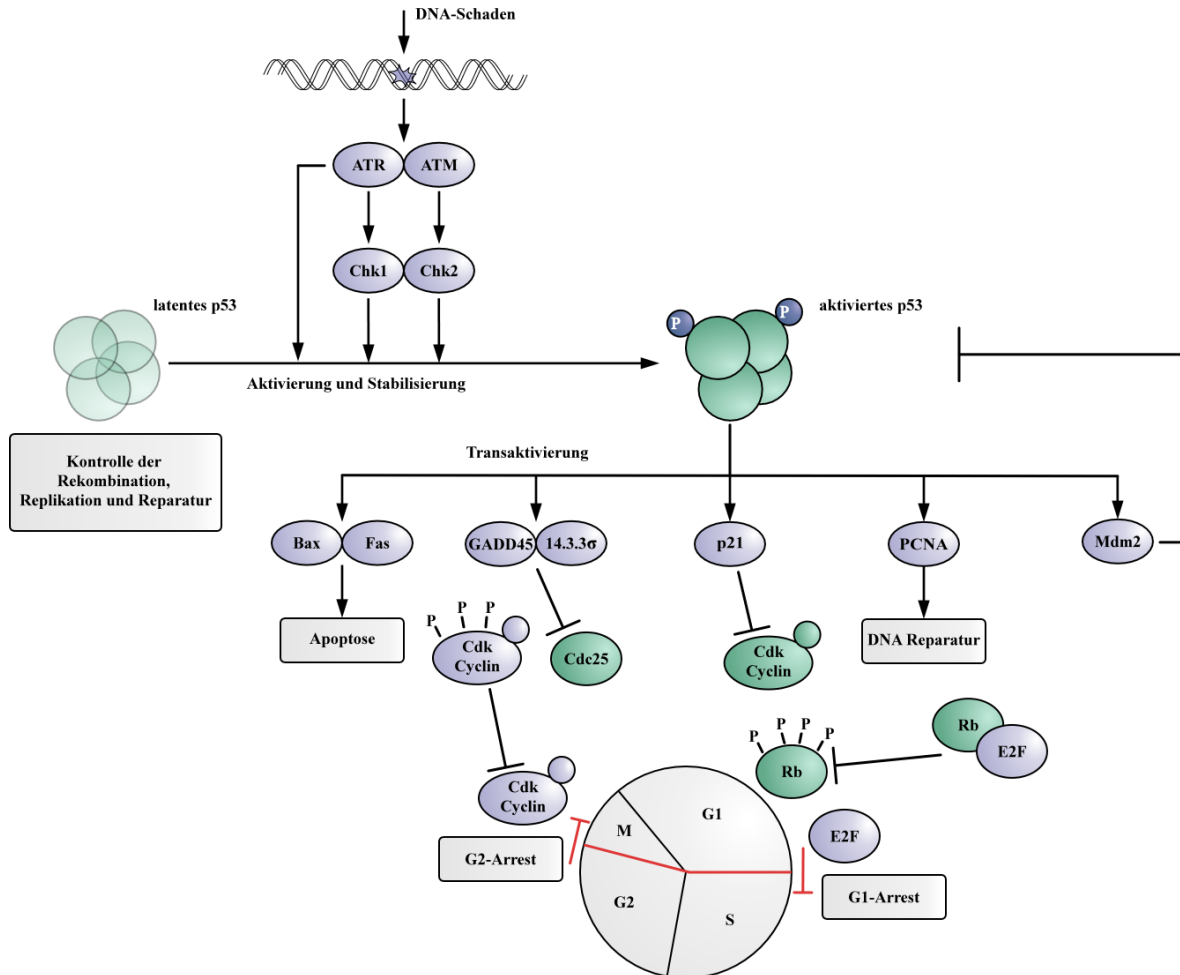


Abbildung 2.17: Aktivierung und Funktion des Tumorsuppressorproteins p53, modifiziert nach Eismann [2005]. ATM, „ataxia telangiectasia mutated“; ATR, ATM- und Rad3 verwandte Proteinkinase; Bax, proapoptotisches Protein; Cdc25, Phosphatase; Cdk, Cyclin-abhängige Kinase; Chk1/2; Kinase; E2F, Transkriptionsfaktor; Fas, Todesrezeptor; GADD45, „growth arrest and DNA-damage inducible protein 45“; Mdm2, „mouse double minute chromosome 2“; p21, Cdk-Inhibitor der CIP/KIP-Familie; PCNA, Proliferating Cellular Nuclear Antigen; Rb, Retinoblastom-Protein; 14.3.3σ, Phosphataseinhibitor.

Funktionen des p53-Proteins Je nach Grad des DNA-Schadens werden durch p53 Zielgene transaktiviert, welche einen Zellzyklusarrest initiieren, an der DNA-Reparatur teilnehmen oder gegebenenfalls die Apoptose einleiten [Helton und Chen, 2007; Offer et al., 1999; Zhou et al., 2001].

Der Zellzyklus gliedert sich in eine Synthese-Phase (S-Phase) in der die DNA repliziert wird und in eine Phase der Zellteilung (Mitose, M-Phase), in der die Chromosomen auf die Tochterzellen

verteilt werden. Diese Phasen sind durch die gap-Phasen G_1 und G_2 voneinander getrennt. Hier existieren verschiedene Kontrollpunkte, an denen die Integrität des Genoms überprüft wird. Bei der Erkennung von Fehlern im Erbgut kommt es zu einem p53-vermittelten Arrest der Zellteilung, wodurch der Zelle Zeit für verschiedene DNA-Reparaturprozesse eingeräumt wird. Der G_1 /S-Arrest wird durch Transaktivierung des für p21 codierenden Gens durch p53 bewirkt. Das p21-Protein inhibiert die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk2 und Cdk4/6 [Xiong et al., 1993], die in der Folge den Tumorsuppressor pRb nicht mehr sequentiell phosphorylieren können. Hypophosphoryliertes pRb bindet an den Transkriptionsfaktor E2F und unterbindet dadurch die Transkription von Genen, die für den Übergang aus der G_1 -Phase in die S-Phase notwendig sind [Ewen et al., 1993; Hinds et al., 1992]. Der G_2 /M-Übergang wird vor allem durch den CyclinB/Cdk1-Komplex reguliert, der durch die Phosphatase Cdc25 dephosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Ein Arrest dieses Übergangs wird durch die p53-abhängige Expression des Phosphataseinhibitors 14-3-3 σ herbeigeführt, indem dieser Cdc25 inaktiviert und somit die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk1 unterbindet [Chan et al., 1999]. Daneben soll auch GADD45 („growth arrest and DNA-damage inducible protein 45“) durch Bindung an Cdk1 die Aktivität des CyclinBCdk1-Komplexes hemmen [Zhan et al., 1999].

Bei anhaltendem zellulären Stress und irreparabler Zellschädigung ist p53 in der Lage Apoptose zu induzieren. Hierzu verschiebt p53 das Gleichgewicht zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Proteinen über transkriptionelle Transaktivierung zugunsten ersterer [Danial und Korsmeyer, 2004]. Zu den p53-abhängigen pro-apoptotischen Genen gehören u.a. Bad, Bax, Puma und Noxa [Jiang et al., 2006; Miyashita und Reed, 1995]. Zudem kann p53 den Promotor des Fas-Rezeptor-Gens aktivieren, wodurch der todesrezeptorgekoppelte apoptotische Signalweg induziert wird [Aktories et al., 2009].

Darüber hinaus wirkt p53 protektiv durch die Transaktivierung von DNA-Reparaturgenen. So stehen u.a. PCNA („proliferating cell nuclear antigen“) [Shivakumar et al., 1995] und MSH2 („MutS homologue-2“) [Warnick et al., 2001] unter der Kontrolle des p53-Proteins.

Das „dual role model of p53“ impliziert zudem, dass nicht nur dem aktiviertem, sondern auch dem Transkriptions-inaktiven, latenten p53, eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität zukommt. So ist latentes p53 möglicherweise direkt an der Reparatur von endogenen DNA-Schäden beteiligt, um Fehler in DNA-Reparaturprozessen und in der DNA-Replikation zu verhindern [Janus et al., 1999].

2.7.3 Induktion von Mikrokernen

Mikrokerne

Als Mikrokerne („micronucleus“, MN) werden von einer Kernmembran umgebene chromatinhaltige Strukturen bezeichnet, welche zusätzlich zum Hauptkern im Zytoplasma vorkommen. Die Unterscheidung zum Hauptkern erfolgt aufgrund ihrer deutlich geringeren Größe. Der Verlust von Chromatin aus dem Hauptkern und somit die Entstehung von MN kann spontan auftreten

oder durch schädliche Einflüsse induziert werden. Dabei können MN entweder Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen enthalten [Fenech, 2000]. MN, die aus Chromosomenfragmenten bestehen (zentromer-negativ), entstehen aufgrund von DNA-Schäden, wie DNA-Doppel- („double strand break“, dsb) oder -Einzelstrangbrüchen („single strand break“, ssb). Diesen MN liegt ein klastogener genotoxischer Effekt zugrunde [Moore et al., 1996]. Eine Substanz, die als Klastogen wirkt und eine chromosomenbrechende Wirkung besitzt, ist 4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO) [Yamada et al., 1993]. Ganze Chromosomen enthaltende MN (zentromer-positiv) sind in der Regel größer als letztere und treten infolge einer Chromosomenfehlverteilung nach direkter Beeinflussung der mitotischen Spindel oder der Kinetochore auf. Sie deuten auf einen aneugen genotoxischen Effekt hin. Ein bekanntes Aneugen ist das Alkaloid der Herbstzeitlose Colchicin [Guha und Bhattacharyya, 1997]. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass fehlverteilte Chromosomen nicht grundsätzlich zur Entstehung eines MN führen müssen. 30 % dieser Chromosomen werden in den Hauptkern eingebunden [Heddle et al., 1991]. Ebenso führen strukturelle Chromosomenaberrationen wie Inversion oder Translokation zu keiner Fragmentierung, womit MN lediglich ein quantitatives Maß für chromosomale Schäden darstellen.

Abb. 2.18 zeigt einen Überblick über die Ereignisse, die zu einer Entstehung von MN mit Chromosomenfragmenten führen können. Zudem wird verdeutlicht, wieviel Zeit es bedarf, bis ein genetischer Schaden in Abhängigkeit des Zeitpunkts seiner Induktion als MN sichtbar wird [Lehmann, 2002].

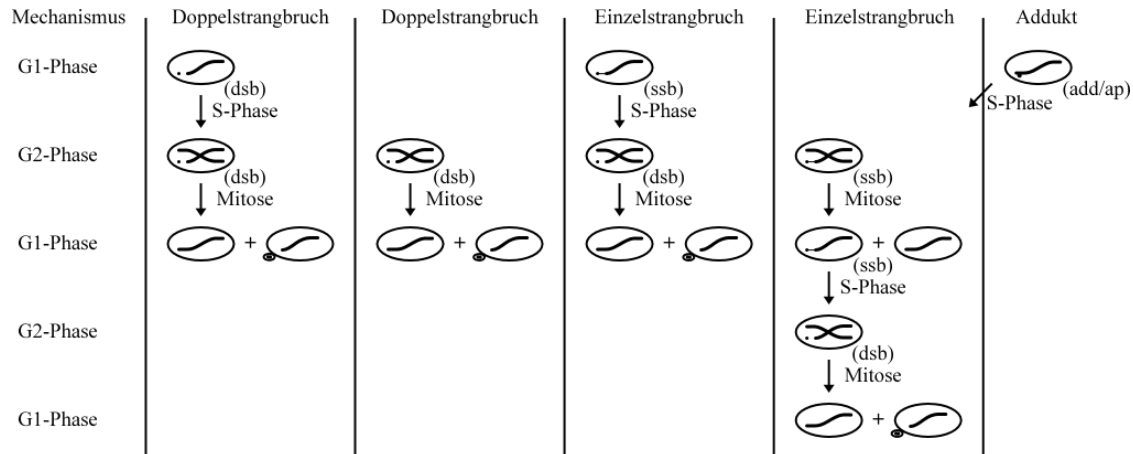


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung für die Entstehung von Mikrokernen. dsb, Doppelstrangbruch; ssb, Einzelstrangbruch; add, DNA-Addukt; ap, Apurine/apyrimidine Stelle [Lehmann, 2002].

Das Auftreten von MN, welche ganze Chromosomen enthalten, kann indes zu einem früheren Zeitpunkt festgestellt werden, da Zellen hierfür die Mitose aber nicht zwingend die S-Phase durchlaufen müssen [Lehmann, 2002]. Herauszustellen ist, dass Zellen zur Bildung eines MN zumindest eine Zellteilung vollziehen müssen.

Mikrokerntest (MN-Test)

Die Induktion von MN wird mithilfe des Mikrokern (MN)-Tests erfasst. Dieser wird seit 1937 als Indikator für eine genotoxische Exposition eingesetzt [Ramirez und Saldanha, 2002]. Dabei existiert neben dem klassischen MN-Test (sog. Einzelkernmethode) eine modifizierte Form, welche als Doppelkernmethode oder auch als CB („cytokinesis blocked“)-Mikrokerntest bezeichnet wird. Der CB-MN-Test basiert auf der Hemmung der Zytokinese durch den Einsatz von Cytochalasin B, wodurch bei der Zellteilung doppelkernige Zellen entstehen. Hierdurch wird sichergestellt, dass bei der Auswertung des Tests lediglich Zellen erfasst werden, die eine Mitose vollzogen haben. Jedoch sind die Ergebnisse des MN-Tests mit und ohne Cytochalasin B bei Verwendung von Zelllinien, die eine geringe Verdopplungszeit aufweisen, wie z.B. den V79-Zellen, vergleichbar [Kalweit et al., 1999]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf den Einsatz des Zytokinese-Blockers verzichtet.

Die Unterscheidung zwischen MN, welche aus ganzen Chromosomen bestehen und solchen, die Chromosomenfragmente enthalten, wird mithilfe einer immunologischen Fluoreszenzmarkierung von Kinetochorproteinen ermöglicht. Als Primär-Antikörper werden Anti-Kinetochor-Antikörper (CREST-Antikörper) verwendet, welche aus dem Serum von Scleroderma pigmentosum Patienten stammen. Die Abkürzung CREST leitet sich von der Vielzahl an Symptomen ab, die bei dieser seltenen Krankheit auftreten (Calcinosis cutis, Raynaud-Phänomen, Esophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie und Teleangiektasien).

Im Rahmen einer Standardisierung des MN-Testverfahrens existieren Anforderungen an einige Versuchsparameter, welche nachfolgend kurz erläutert werden [Kirsch-Volders et al., 2000; Miller et al., 1998]. So sollte u.a. bei der Wahl der Zelllinie sowohl die Verdopplungszeit als auch die spontane Mikrokernelrate in Betracht gezogen werden [Kirsch-Volders et al., 2000], wobei insbesondere die Hamsterzelllinien V79 und CHO sowie Humanlymphozyten vorgeschlagen werden [Miller et al., 1998]. Daneben ist hinsichtlich der Fixierung der Zellen eine Methode zu verwenden, welche die Aufrechterhaltung der Zellmembran-Integrität gewährleistet. Bezüglich des Inkubationsverlaufs wird von Miller et al. [1998] im Anschluss an die Substanzexposition eine substanzfreie Nachinkubationszeit von mind. 0,5 Verdopplungszeiten vorgeschlagen. Des Weiteren existieren Bestimmungskriterien für MN (Einzelkernmethode) und Tochterkerne in zweikernigen Zellen (Doppelkernmethode). Im Folgenden werden die für die in dieser Arbeit eingesetzte Einzelkernmethode relevanten Anforderungen an MN aufgelistet:

- Der Durchmesser sollte $1/16$ bis $1/3$ des Kerndurchmessers betragen.
- Es sollte keine Verbindung zum Hauptkern vorhanden sein.
- Der Hauptkern kann berührt aber nicht überlappt werden. Die Grenze des Mikrokerns muss von der Kernmembran klar unterscheidbar sein.
- Die Farbtintensität sollte mit der des Hauptkerns vergleichbar sein, kann aber auch gelegentlich intensiver gefärbt sein.
- Zudem sollten keine Mikrokerne in apoptotischen Zellen gezählt werden [Kirsch-Volders et al., 2000].

Die Durchführung des MN-Tests wurde unter Berücksichtigung der in diesem Abschnitt beschriebenen Anforderungen durchgeführt und ist in Kapitel 5 Abschnitt 5.12.3 im Detail beschrieben.

2.8 Kohlenstoffnanoröhren (CNT)

Kohlenstoffnanoröhren („carbon nanotube“, CNT) gelten als die wichtigsten und meist untersuchten Nanomaterialien der Gegenwart [Kumar, 2006]. Neben Graphit, Diamant und Fullerenen stellen CNTs eine weitere allotrope Form des Kohlenstoffs dar und existieren in zwei unterschiedlichen Modifikationen: Als mehrwandige („multi-walled“, MW) und einwandige („single-walled“, SW) Nanoröhren. Die Entdeckung von CNTs ging von MWCNTs aus, die 1991 als Nebenprodukte der Fullersynthese identifiziert wurden. Der Versuch MWCNTs zur Herstellung von Nanodräh-ten mit Metallen zu füllen, führte 1993 zur Metall-katalysierten Synthese von SWCNTs [Iijima, 1991; Bethune et al., 1993].

In diesem Abschnitt werden Struktur und Eigenschaften von CNTs erläutert. Im Weiteren wird auf Herstellungs- und Aufreinigungsverfahren eingegangen, wobei der Schwerpunkt insbesondere auf die für die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs eingesetzten Verfahren gelegt wird. Zudem sollen Anwendungsmöglichkeiten von CNTs in Technik und Biowissenschaften vorgestellt sowie ein Überblick über die bisherige Datenlage toxikologisch relevanter Untersuchungen innerhalb des CNT-Forschungsgebiets gegeben werden.

2.8.1 Struktur und Eigenschaften

Im Vergleich zu Diamant, welcher aufgrund der sp^3 -Hybridisierung der Kohlenstoffatome eine fest kovalent gebundene und somit starre dreidimensionale Struktur darstellt, liegen bei den verbleibenden Kohlenstoffallotropen lediglich drei Bindungen (vorwiegend sp^2 -Hybridisierung) in einer Ebene vor und führen zur Ausbildung einer hexagonalen Ordnung, ähnlich der eines Wabenmusters. Derartige Graphitschichten zeichnen sich durch hohe Flexibilität aus und lassen sich daher krümmen und bspw. zu Zylindern formen. Diese „aufgerollte“ Allotropie des Kohlenstoffs wird als Kohlenstoffnanoröhre bezeichnet. Während SWCNTs lediglich aus einer aufgerollten Graphitschicht bestehen und Durchmesser im Bereich von 0,4 - 2,0 nm ausweisen, bestehen MWCNTs aus mehrerer solcher Graphitzylinder in konzentrischer Anordnung, was deren größere Durchmesser (1,4 - 100 nm) erklärt. Die Längen von CNTs variieren sehr stark (100 nm - 1 mm), liegen aber häufig im Mikrometerbereich. In Abb. 2.19 ist die Struktur ein- und mehrwandiger CNTs in schematischer und elektronenmikroskopischer Darstellung veranschaulicht [Klingeler et al., 2007; Kumar, 2006].

In Abhängigkeit des Krümmungsradius und der Richtung, in der die Graphitschicht aufgerollt ist, können CNTs unterschiedlicher Modifikationen entstehen. Allerdings gibt es einen minimalen Krümmungsradius, so dass die dünnsten beobachteten CNTs einen Durchmesser von 0,4 nm aufweisen [Klingeler et al., 2007]. Grundsätzlich wird zwischen „armchair“ (Sessel)-, „zigzag“ (Zickzack)- und „chiralen“ Nanoröhren unterschieden. Die Bezeichnungen „armchair“ und

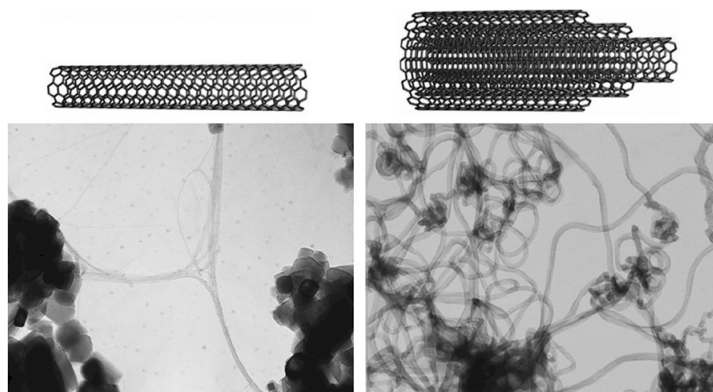


Abbildung 2.19: Schematische und elektronenmikroskopische (TEM) Darstellung von SWCNTs (links) und MWCNTs (rechts) [Donaldson et al., 2006].

„zigzag“ leiten sich vom geometrischen Verlauf der Kohlenstoffatome am Saum der Röhren ab. Während diese beiden Röhrenarten Spiegelsymmetrie besitzen, ist der Begriff „chiral“ CNTs vorbehalten, welche in Form zweier nicht in Deckung zu bringender Enantiomere mit rechts- bzw. linksgängigem Schraubengang existieren [Balasubramanian und Burghard, 2005].

Aufgrund ihrer hexagonalen Struktur besitzen CNTs eine Reihe herausragender Eigenschaften, die sie für die Materialwissenschaften interessant machen. Dazu gehört, dass sie sehr widerstandsfähig gegenüber mechanischen Belastungen sind, was sich in einer hohen Biegsamkeit ausdrückt. So entspricht das Elastizitätsmodul (E-Modul) von CNTs dem von Diamant, welches mit einem E-Modul von 1 TPa als die gegen plastische Verformung resistenteste Struktur bekannt ist. Weiterhin besitzen CNTs eine hohe Zugfestigkeit entlang der Zylinderachse (~ 45 GPa) bei gleichzeitig geringer Dichte ($1,3 \text{ g/cm}^3$) (vgl. Stahl: 2 GPa, $7,8 \text{ g/cm}^3$) [Salvetat-Delmotte und Rubio, 2002]. Auch die Wärmeleitfähigkeit entlang der Zylinderachse ist mit $6000 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ außergewöhnlich hoch (vgl. Diamant $3320 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) [Wei et al., 2001]. Zudem sind CNTs in Abhängigkeit ihrer strukturellen Modifikation elektrisch leitend oder halbleitend, wobei auch Supraleitung beobachtet werden konnte [Tang et al., 2001].

2.8.2 Herstellungs- und Aufreinigungsverfahren von CNTs

Zur Herstellung von CNTs haben sich folgende drei Verfahren etabliert:

- Lichtbogenentladung („arc discharge“),
- chemische Gasphasenabscheidung („chemical vapor deposition“) und
- Abtragung mittels Laser („laser ablation“).

Allen drei Methoden gemein ist die Fragmentierung einer Kohlenstoffverbindung unter Zuführung von Energie sowie die nachfolgende Rekombination der Fragmente zu Nanoröhren. Zudem nutzen alle genannten Syntheseverfahren Metalle als Katalysatoren. Hierbei sind insbesondere Übergangsmetalle wie Fe, Co, Ni oder Mo geeignet, da diese auch unter hohen Temperaturen katalytische Aktivität zeigen und Keimbildung und Wachstum von röhrenförmigen Strukturen

begünstigen [Klingeler et al., 2007; Kumar, 2006]. Die Größe der Katalysatorpartikel bestimmt dabei den Durchmesser der Nanoröhren und damit auch die Anzahl der Graphitebenen in deren Hülle. Der zugrunde liegende Mechanismus der CNT-Bildung wird kontrovers diskutiert [Cassell et al., 1999; Sinnott et al., 1999]. Im Wesentlichen wird angenommen, dass sich die Kohlenstofffragmente auf dem metallischen NP absetzen bzw. mit dem unter Herstellungstemperaturen im flüssigen Zustand befindlichen Metallkatalysator verschmelzen, nachfolgend zu einem röhrenartigen Graphitnetzwerk heranwachsen und sich bei Erreichen einer definierten Länge von den Katalysatorpartikeln absondern [Kumar, 2006]. Dieser Prozess ist in Abb. 2.20 schematisch und durch elektronenmikroskopische Aufnahmen veranschaulicht. Während der Gehalt an katalysierenden Metallpartikeln in SWCNTs bis zu 30 wt.% (Gewichtsprozent) betragen kann, ist dieser bei MWCNTs mit einem Gehalt von bis zu 5 wt.% weitaus geringer.

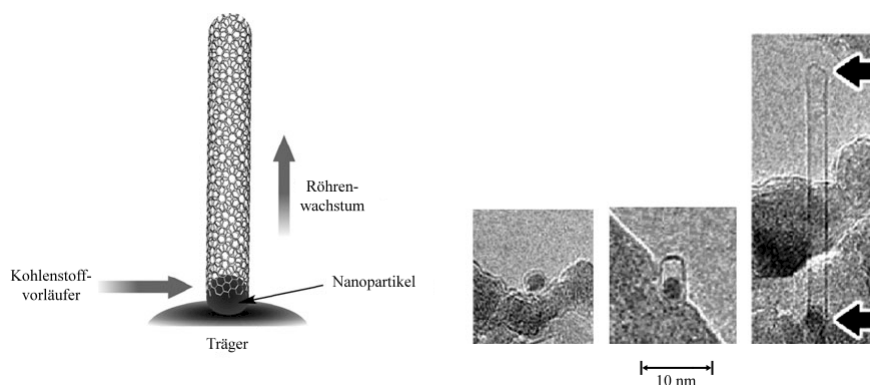


Abbildung 2.20: Möglicher Wachstumsmechanismus von CNTs in schematischer (links) und elektronenmikroskopischer (TEM, rechts) Darstellung, modifiziert nach Dai [2002].

Da die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs mittels Laserablation synthetisiert wurden, wird nachfolgend lediglich dieses Verfahren näher betrachtet.

Bei der Laserablation werden Graphitstäbe als Kohlenstoffquelle in einer beheizten Reaktionskammer durch einen Hochleistungslaser unter inerter Atmosphäre verdampft. Aufgrund der hohen Temperaturen (ca. 1200 °C) bilden sich Atome und Atom-Kluster, die zu Nanoröhren wachsen können [Donaldson et al., 2006]. Sind dem Graphit Katalysatorpartikel beigemischt, tritt bevorzugt die Bildung von SWCNTs auf [Hennrich, 2000]. Die Laserablation eignet sich insbesondere für die Herstellung von SWCNTs bzw. dünnen MWCNTs mit hoher Kristallinität und guter Ausbeute und erlaubt aufgrund der effektiven Prozesskontrolle eine detaillierte Analyse des Syntheseprozesses. Abb. 2.21 zeigt eine schematische Darstellung einer Apparatur zur Synthese von SWCNTs, wie sie für die Ni- und Co-katalysierte Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs verwendet wurde. Kernstück der Apparatur ist der Ofen mit integriertem T-förmigen Quarzrohr, in dem sich der Graphitstab befindet. Das Graphit wird mit einem zweipulsigen Laserstrahl verdampft. Senkrecht zum Laserstrahl befindet sich ein Argonfluss, der die erzeugten SWCNTs in eine Papierfilterhülse befördert [Hennrich, 2000; Lebedkin et al., 2002]. Mit einer derartigen Apparatur können etwa 300 mg SWCNT-Ruß pro Stunde produziert werden, wobei die höchsten Ausbeuten an SWCNTs (ca. 50 wt.% des SWCNT-Rußes) mit den in Abb. 2.21

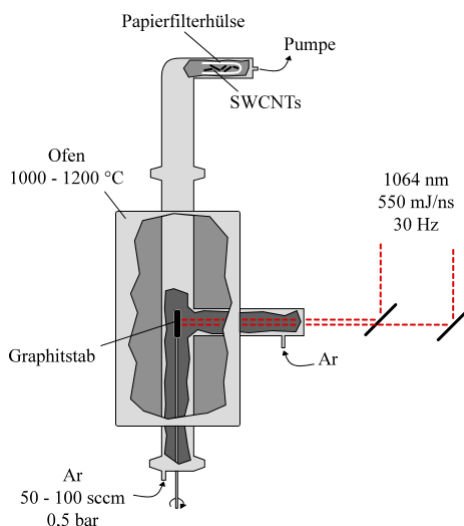


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung einer Apparatur zur Herstellung von SWCNTs, modifiziert nach Hennrich [2000]. sccm („standard cubic centimeter“) beschreibt ein Gasvolumen von einem Kubikzentimeter unter Normbedingungen.

aufgeführten Prozessparametern erzielt werden [Hennrich, 2000].

Im Anschluss an den Fertigungsprozess müssen CNT-Verunreinigungen in Form von Trägermaterialien, amorphem Kohlenstoff sowie der bereits erwähnten metallischen Katalysatorpartikel entfernt werden. Hierzu können die SWCNTs entweder einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen oder oxidativ bzw. nicht-oxidativ aufgearbeitet werden. Letztere Methode ist nicht destruktiv, sodass die Struktur der SWCNTs erhalten bleibt. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um verschiedene Filtrationsschritte. Die oxidative Reinigung besteht aus der Behandlung mit Mineralsäuren (HCl , HNO_3 , H_2SO_4) bei erhöhter Temperatur ($100 - 150^\circ\text{C}$), stellt jedoch ein destruktives Verfahren dar, da bereits vorhandene Defektstellen mit fortlaufender Oxidationsdauer größer werden. Es hat allerdings den Vorteil, dass sich SWCNTs hoher Reinheit ergeben, so dass hinsichtlich dieser Aufreinigungsmethode unter Beachtung der späteren Verwendung der CNTs Vor- und Nachteile gegeneinander abzuwägen sind [Vivekchand et al., 2005; Endo et al., 2005].

Bezüglich einer Verifizierung der Reproduzierbarkeit definierter CNT-Eigenschaften haben sich im Wesentlichen folgende Methoden durchgesetzt: Transmissions (TEM)-, Rasterelektronen- (REM)- sowie Rasterkraft („atomic force microscopy“, AFM)-mikroskopie, Raman-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse und UV/Vis-NIR-Spektroskopie. Der Einsatz dieser Methoden gibt Aufschluss über CNT-Eigenschaften wie u.a. Durchmesserverteilung, metallische Eigenschaften oder Bündelungsgrad und kann somit zur Charakterisierung des hergestellten Materials herangezogen werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Einsatz von Iodixanol aufgereinigt. Iodixanol ist ein mehrfach iodiertes nichtionisches Benzolderivat, welches gegenüber anderen iodierten Dichtegradienten in zweierlei Hinsicht vorteilhaft ist: Zum Einen sind Lösungen von Iodixanol in Wasser bis zu einer Dichte von $1,32\text{ g/ml}$ isoos-

motisch. Zum Anderen bildet diese Verbindung selbst-generierend innerhalb von ein bis drei Stunden einen Gradienten aus [Ford et al., 2002]. Die Charakterisierung der untersuchten SW-CNTs erfolgte mittels Raman-Spektroskopie und AFM und ist in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Kurze Erläuterungen zu den Analysemethoden sind den Abschnitten 5.3 und 5.4 zu entnehmen.

2.8.3 Anwendungsgebiete von CNTs

Besonderes Interesse an CNTs besteht in der Elektronikindustrie, deren Ziel u. a. die stete Verkleinerung elektronischer Strukturen ist. Ein Einsatz von CNTs als Transistoren oder in Computer- und Fernsehbildschirmen ist denkbar [Graham et al., 2005]. Eine weitere Anwendung ist die Beschichtung von Oberflächen durch sog. „Nanoröhrenteppiche“, wobei superhydrophobe Oberflächen mit einer dem Lotuseffekt ähnlich geringen Benetzbarkeit entstehen [Li et al., 2007]. Neben technischen Anwendungen wurden Applikationen in den Biowissenschaften untersucht. CNTs wurden als optimaler Träger für hochempfindliche Biosensoren erkannt, darunter Sensoren für Glukose, Insulin oder Stickstoffmonoxid [Balasubramanian und Burghard, 2006]. Zudem könnten CNTs aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit bei der künstlichen Herstellung von Gewebe („tissue engineering“) als stabile Matrizen, an denen das Gewebe anwachsen kann, Anwendung finden. So existieren bereits erste Studien, in denen CNTs als stabilisierendes und verfestigendes Gerüst zur Herstellung von Knochen- oder Nervengewebe eingesetzt wurden [MacDonald et al., 2005]. Nicht zuletzt wird der Einsatz von CNTs im Lebensmittelsektor als verstärkende Komponente in Verpackungen diskutiert [Chaudry et al., 2008; FAO und WHO, 2009; Sozer und Kokini, 2009].

Neben den Einsatzmöglichkeiten von CNTs, die aus ihren strukturellen, elektrischen und mechanischen Eigenschaften resultieren, eröffnen sich zudem neue nanotechnologische Anwendungen, welche sich den hohlen Innenraum dieser Nanomaterialien zunutze machen. Diesbezüglich hat sich in den letzten Jahren ein weiteres Forschungsfeld entwickelt, welches sich mit dem zellulären Substanztransport durch CNTs beschäftigt. Funktionalisierte und mit Fremdmolekülen beladene CNTs könnten so bspw. DNA-Plasmide, RNA, Peptide oder Tracermoleküle wie Farbstoffe und radioaktive Verbindungen in Zellen einschleusen und somit als Transportvehikel dienen. Auch der Einsatz von CNTs in der Therapie von Krebserkrankungen ist denkbar. Weiterführendes hierzu ist Kam und Dai [2005] oder Pastorin et al. [2006] zu entnehmen.

2.8.4 Toxikologische Betrachtung von CNTs

Aufgrund der zunehmenden Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten bieten CNTs ein enormes Marktpotential, weshalb die großindustrielle Produktion stetig ansteigt. Marktforschungsanalysen zufolge soll der Nanoröhren-Markt bis zum Jahre 2013 mit einer jährlichen Rate von etwa 25 % anwachsen [Flegentreu, 2008]. Führende Hersteller produzieren gegenwärtig bereits mehrere hundert Tonnen CNTs im Jahr und investieren nach aktuellen Prognosen verstärkt in weitere Produktionskapazitäten [Flegentreu, 2008]. Mit wachsender Produktion steigt jedoch auch die

Exposition von Mensch und Umwelt gegenüber dieser Klasse der Nanomaterialien, was der Forderung nach einer fundierten Datenlage zu ihrem toxikologischen Potential zunehmend Gewicht verleiht.

Für die toxikologische Beurteilung von CNTs unter Berücksichtigung möglicher Expositionspfade, der Aufnahme und Verteilung im Körper, zellulärer Aufnahmemechanismen sowie möglicher Wirkungen in der Zelle gelten grundsätzlich ähnliche Betrachtungen wie sie in Abschnitt 2.5 für Nanomaterialien im Allgemeinen erläutert sind. Vorwiegend in Zusammenhang mit CNTs stehende Beobachtungen aus Expositions- und Translokationsstudien sowie toxikologischen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen sollen in diesem Abschnitt ergänzend herausgestellt werden. Aufgrund der Vielzahl von Studien, welche sich mit diesem Forschungsgebiet beschäftigen, wird in diesem Abschnitt jedoch lediglich ein repräsentativer Überblick über die existierende Datenlage gegeben.

2.8.4.1 Betrachtungen zur Exposition

Die Exposition gegenüber CNTs kann während allen Abschnitten ihres Lebenszyklus wie der Herstellung und Weiterverarbeitung sowie ihrer Applikation in Produkten oder ihrer Entsorgung erfolgen [Helland et al., 2007; Kumar, 2006]. Der Einsatz von CNTs in herkömmlichen Produkten, die mit dem Verbraucher in Kontakt treten können, ist derzeit noch in Entwicklung [FAO und WHO, 2009]. Auch die Entsorgung von CNTs leistet bislang eher einen unwesentlichen Beitrag zur Exposition, wenn auch CNTs bei der Säuberung der Produktionsanlagen in die Umweltkompartimente (Luft, Wasser und Boden) entlassen werden können.

Vordergründig bei der Exposition des Menschen ist vielmehr die Freisetzung von CNT-Aerosolen während der industriellen Nanoröhren-Fertigung. Diese berufsbedingte Exposition betrifft vorwiegend Mitarbeiter entsprechender Produktionsstätten. Maynard et al. [2004] zeigten, dass SW-CNTs während der einzelnen Produktionsphasen in Größen, welche in den Respirationstrakt vordringen können, in die Umgebungsluft freigesetzt werden. Wenngleich die bei diesen Untersuchungen festgestellten Mengen mit Gehalten $< 53 \mu\text{g}/\text{m}^3$ als gering einzustufen sind, wird der voraussichtliche Produktionsanstieg die Exposition gegenüber industriell gefertigten CNTs zukünftig erheblich erhöhen. Zudem konnte in der gleichen Studie die Deposition dieses Nanomaterials auf Arbeitshandschuhen in Mengen von 0,2 bis 6 mg je Handschuh festgestellt werden, was die CNT-Anreicherung in der Arbeitsumgebung zusätzlich verdeutlicht. Aber auch die Gesamtbevölkerung ist der Inhalation von ubiquitär vorkommenden CNTs, die durch industrielle und andere Verbrennungsprozesse aber auch bei Waldbränden [Murr et al., 2004a] oder bei täglichen Arbeitsabläufen im Haushalt (Kochen am Gasherd) in Größen von 3 - 30 nm freigesetzt werden, ausgesetzt [Bang et al., 2004; Kumar, 2006; Merchan-Merchan et al., 2003; Murr et al., 2004b; Murr et al., 2004a]. So wird in der Mehrzahl der Studien zur toxikologischen Bewertung von CNTs die Inhalation als der Aufnahmeweg mit dem höchsten gesundheitlichen Risiko betrachtet.

Daneben sollte ebenfalls die orale Aufnahme von CNTs in toxikologischen Untersuchungen zunehmend berücksichtigt werden. CNTs werden als eine der am schlechtesten biologisch abbau-

baren Materialien diskutiert. Aufgrund ihrer Biopersistenz und ihrem lipophilen Charakter [Wu et al., 2006, Helland et al., 2007], könnten sich CNTs innerhalb der Nahrungskette anreichern. Oberdörster et al. [2005c] konnten bereits die Bioverfügbarkeit von SWCNTs in aquatischen Organismen nachweisen. Zudem wird vermutet, dass CNTs von Mikroorganismen und Wurzeln aufgenommen werden und somit in Pflanzengewebe akkumulieren können. Für die Ausweitung des CNT-Einsatzes in den Lebensmittelsektor als Additiv in Verpackungsmaterialien gewinnt die Ingestion von CNTs durch deren direkten Kontakt zum Lebensmittel für die Exposition des Menschen an Bedeutung.

2.8.4.2 Untersuchungen zur Translokation und zellulärer Aufnahme

Die Translokation von CNTs betreffend existieren lediglich wenige und zudem gegensätzliche Studien. Wang et al. [2004] haben gezeigt, dass sich funktionalisierte SWCNTs nach intraperitonealer, subkutaner und intravenöser Injektion im gesamten Versuchstier, mit Ausnahme des Gehirns, insbesondere aber in Organen wie dem Magen, der Niere sowie den Knochen verteilt und über den Urin ausgeschieden wurden. Singh et al. [2006] dagegen haben einen schnellen Übergang von NH_3 -SWCNTs vom Blut in den Urin beobachtet, wobei keine Akkumulation in den Organen des Versuchstieres festgestellt werden konnte. Da in diesen Studien jedoch lediglich funktionalisierte CNTs betrachtet wurden, kann keine allgemeingültige Aussage zum Verteilungsmuster dieser Nanomaterialien im Körper getroffen werden.

Die zelluläre Aufnahme von CNTs wurde in zahlreichen Forschungsgruppen untersucht [Kostarelos et al., 2007; Jin et al., 2009; Panarotto et al., 2004; Raffa et al., 2008; 2010; Kam et al., 2005]. Dabei gehen die Meinungen über den Aufnahmemechanismus von CNTs auseinander. Während Kam et al. [2005] in systematischen Inhibierungsstudien unter veränderten Temperaturbedingungen (4 °C) und durch den Einsatz Zucker- und Kalium-freier Zellkulturmedien eine endozytotische und im Speziellen clathrin-vermittelte Internalisierung der in ihrer Studie untersuchten SWCNTs herausstellen konnten, schlagen Panarotto et al. [2004] einen nicht-endozytotischen und demnach ATP-unabhängigen Aufnahmemechanismus vor. Laut Raffa et al. [2010] werden CNT-Aggregate, -Bündel, -Kluster oder monodisperse CNTs mit Längen $> 1 \mu\text{m}$ über die Phagozytose in die Zelle aufgenommen, während pinozytotische Aufnahmemechanismen zur Internalisierung von CNTs mit supramolekularer Struktur zum Einsatz kommen. Diffusion dagegen wird als Internalisierungsmechanismus für CNTs einer Länge $> 1 \mu\text{m}$ angesehen [Raffa et al., 2010].

Die unterschiedlichen Beobachtungen resultieren vermutlich aus der Tatsache, dass in den Studien unterschiedliches CNT-Material auf der Grundlage verschiedener experimenteller Protokolle untersucht wurde.

2.8.4.3 *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen zum toxikologischen Potential

Aufgrund eines erhöhten Inhalationsrisikos von CNTs (siehe Abschnitt 2.8.4.1) existieren zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Studien, welche die toxikologische Wirkung von CNTs im Zusammenhang

mit ihrer Deposition im Respirationstrakt bzw. anhand von Untersuchungen mit Zelllinien des Lungengewebes belegen [Fiorito et al., 2006; Kagan et al., 2006; Jia et al., 2005; Monteiro-Riviere et al., 2005; Muller et al., 2005; Lam et al., 2006; Helland et al., 2007; Huczko et al., 2001; 2005; Shvedova et al., 2003; 2005; Warheit et al., 2004]. Dabei kommt die Mehrzahl der *in vivo* Studien [Grubek-Jarowska et al., 2006; Lam et al., 2006; Muller et al., 2005; Shvedova et al., 2003; 2005; Warheit et al., 2004] infolge histopathologischer Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass CNTs, ungeachtet ihres Herstellungsverfahrens und ihres Verunreinigungsgrads, im Tierversuch nach intratrachealer Instillation (ITI) oder pharygealer Aspiration zu Entzündungserscheinungen führen und darüber hinaus die Bildung von Granulomen und in Langzeitversuchen die Entstehung einer Lungenfibrose begünstigen. Allerdings sind manche dieser Versuchsreihen lediglich als Screenings zu werten. Die ITI bspw. bildet keine realistische Inhalationssituation, in der Fremdpartikel kontinuierlich über einen längeren Zeitraum eingeatmet werden, nach. Es handelt sich lediglich um die Injektion einer Bolusdosis an CNTs in die Luftröhre, wodurch die Wirkungen des verabreichten Materials in den ersten Abschnitten des Respirationstraktes unberücksichtigt bleiben und es zudem zu einer unnatürlichen Verteilung der Fremdpartikel in der Lunge kommt [Kumar, 2006]. Jedoch kann in derartigen Untersuchungen durch den Vergleich mit Kontrolltieren, welchen Referenzverbindungen bekannter Toxizität wie z.B. Quarz oder Ruß verabreicht werden, die relative Toxizität von CNTs ermittelt werden [Lam et al., 2002a; Lam et al., 2002b]. Auch zahlreiche *in vitro* Untersuchungen belegen die pulmonale Toxizität von CNTs [Davoren et al., 2007; Frioto et al., 2006; Kagan et al., 2006; Kisin et al., 2007; Muller et al., 2005; Jia et al., 2005; Shvedova et al., 2005; Soto et al., 2005; Wick et al., 2007]. Neben zytotoxischen Wirkungen wurden u.a. die Bildung von ROS, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-8) sowie eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen beobachtet, wobei sich die Studien hinsichtlich der Dosis-Wirkungsbeziehungen erheblich unterscheiden (Beobachtung zytotoxischer Effekte in einem Konzentrationsbereich von 5 - 800 $\mu\text{g/ml}$). Auch in Untersuchungen an anderen Zelllinien (Haut, Niere, Gebärmutter etc.) wurden u.a. Viabilitätsabnahmen, eine Modulation des zellulären Redoxstatus in Form von ROS-Bildung und GSH-Depletion sowie DNA-schädigende Eigenschaften festgestellt [Bottini et al., 2006; Cui et al., 2005; Ding et al., 2005; Manna et al., 2005; Sayes et al., 2006; Shvedova et al., 2003; Yang et al., 2009; Zhu et al., 2007]. Dabei wurden durch CNTs im Vergleich zu den als Referenzen eingesetzten schädlichen Partikeln aus Ruß und Quarz in vergleichbaren Konzentrationen vereinzelt stärkere Wirkungen hervorgerufen [Donaldson et al., 2006].

Dem gegenüber stehen Studien von Flahaut et al. [2006], Puskamp et al. [2007] oder Wörle-Knirsch et al. [2006], in denen in vergleichbaren CNT-Konzentrationen keine akute Zytotoxizität festzustellen und die Bildung von RS ausschließlich auf metallische Verunreinigungen oder Rückstände von amorphem Kohlenstoff zurückzuführen waren.

Die Kontroversität dieser Erkenntnisse basiert vornehmlich auf dem Einsatz unterschiedlicher Zellmodelle und der Untersuchung von CNT-Spezies verschiedener Herstellungsverfahren und Verunreinigungsgrade. Daneben ist bekannt, dass CNTs mit einer Reihe molekularer Verbindungen, wie u.a. Farbstoffen, Polysacchariden oder Biomolekülen, interagieren und somit Untersu-

chungsergebnisse beeinflussen können [Casey et al., 2005; Wörle-Knirsch et al., 2006; Yang et al., 2009]. Zudem weisen CNTs aufgrund ihres hydrophoben Charakters starke van der Waals Kräfte auf und neigen somit dazu, zu Bündeln zu agglomerieren. Um dieses Verhalten zu unterbinden, werden CNTs oft in sog. „surfactants“ dispergiert, welche ihrerseits Einfluss auf toxikologische Untersuchungen nehmen können. Weiterhin muss in Zusammenhang mit CNTs beachtet werden, dass diese in Abhängigkeit ihrer Länge sowohl den „Nanopartikeln“ als auch den Nanofasern zugerechnet werden und somit ein unterschiedliches Wirkprofil aufweisen können. Während die Wirkungen von NP vornehmlich auf ihrer spezifischen Oberfläche basieren, wird das toxikologische Potential von Fasern durch deren Nadel-ähnliche Form bestimmt. In einem Längenbereich von $> 20 \mu\text{m}$ werden CNTs den Fasern zugezählt, wodurch ihre Wirkungen denen von Asbest oder anderen pathogenen Fasern gleich kommen können [Donaldson et al., 2006; Huczko et al., 2001].

2.9 Platin (Pt)

Platin (Pt, Latein = Platinum) ist ein metallisches Element aus der 8. Nebengruppe des Periodensystems der Elemente (PSE) und bildet zusammen mit Palladium (Pd), Rhodium (Rh), Osmium (Os), Iridium (Ir) und Ruthenium (Ru) aufgrund eines chemisch ähnlichen Verhaltens die Gruppe der Platingruppenelemente (PGE) oder sog. Platinmetalle. In der Natur kommt Pt in der Regel zusammen mit den anderen Platinmetallen entweder gediegen oder als Mineral (u.a. Sperrylith, Platinarsenid; Geversit, Platinsulfid) vor [Reher und Rüdel, 2004; Römpf, 1997].

Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die Eigenschaften von Pt gegeben und auf das Herstellungsverfahren der in dieser Arbeit untersuchten Pt-NP eingegangen. Im Weiteren werden die Anwendungsgebiete von Pt, unter besonderer Berücksichtigung von Pt in nanostrukturierter Form, sowie die bisherige Datenlage zum toxikologischen Potential von Pt und seinen Erscheinungsformen dargestellt. Dabei werden neben Pt-NP auch makrostrukturiertes Pt⁰ sowie Pt-Verbindungen und -Komplexe in die Betrachtungen einbezogen, da diese im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit von Relevanz sind.

2.9.1 Eigenschaften von Pt

Reines Pt ist je nach Verteilungsgrad ein graues oder silberglänzendes weiches Schwermetall. Wie die anderen Metalle der Platingruppe, zeigt auch Pt ein widersprüchliches chemisches Verhalten. Einerseits ist es, für Edelmetalle charakteristisch, chemisch inert ($\epsilon_0(\text{Pt}/\text{Pt}^{2+}) = + 1,118 \text{ V}$) andererseits verhält es sich unter bestimmten Reaktionsbedingungen gegenüber gewissen Substanzen hochreaktiv und katalytisch-selektiv. Platin ist unter Standardbedingungen (22 °C, 1 bar) gegenüber H₂SO₄, HCl, HNO₃ und anderen anorganischen Säuren beständig. Dagegen wird es von Königswasser unter Bildung von rotbrauner Hexachloroplatin(IV)-säure sowie von Brom bereits bei Zimmertemperatur, von HBr, HI, Wasserstoffperoxid und konzentrierter HNO₃ bei

100 °C und von Phosphorsäure und KCN bei Temperaturen ab etwa 400 °C angegriffen. Unter starkem Erhitzen bildet Pt an der Luft in geringem Umfang flüchtiges PtO_2 [Holleman und Wiberg, 1995].

Eine charakteristische Eigenschaft von Pt stellt die Adsorption von Wasserstoff dar, welches aufgrund dessen reaktionsfreudiger wird und somit für Hydrierungen eingesetzt werden kann [Holleman und Wiberg, 1995]. Auch ungesättigte organische Verbindungen werden leicht an der Pt-Oberfläche gebunden, worauf die hervorragenden katalytischen Eigenschaften von Platin basieren. Durch den Einsatz von porösem Platin können diese Eigenschaften aufgrund einer Oberflächenvergrößerung zusätzlich verbessert werden.

Neben Pt^0 ist Pt auch in anderen Oxidationsstufen (I bis IV) vorzufinden, wobei Platin(II)- und Platin(IV)-Verbindungen am häufigsten vorkommen. Zudem neigt Pt sehr stark zur Bildung von Koordinationsverbindungen (Platinaten).

2.9.2 Herstellung von Pt-NP mittels SFRD-Verfahren

Das SFRD („supercritical fluid reactive deposition“)-Verfahren ist den „Bottom - up“-Herstellungsmethoden zuzurechnen und basiert auf der Reaktivabscheidung von Metallen aus überkritischen Fluiden (SCF). Prinzipiell wird bei diesem relativ neuen Verfahren der metallorganische Komplex zunächst in SCF, gelöst und dringt daraufhin, bedingt durch die gasähnlichen Transporteigenschaften von SCFs, in die Mesoporen des Trägermaterials ein. Anschließend wird der gelöste Metallkomplex in der homogenen überkritischen Phase durch die isobare Zugabe von Wasserstoff reduziert und nachfolgend durch eine schnelle Druckabsenkung direkt in dem porösen Träger abgeschieden. Somit ermöglicht dieses Verfahren die gezielte Herstellung von Metall-NP in einem einzigen, integrierten Verfahrensschritt [Garrido et al., 2008; Zhang und Erkey, 2006]. Der Verlauf des SFRD-Verfahrens ist in Abb. 2.22 schematisch veranschaulicht.

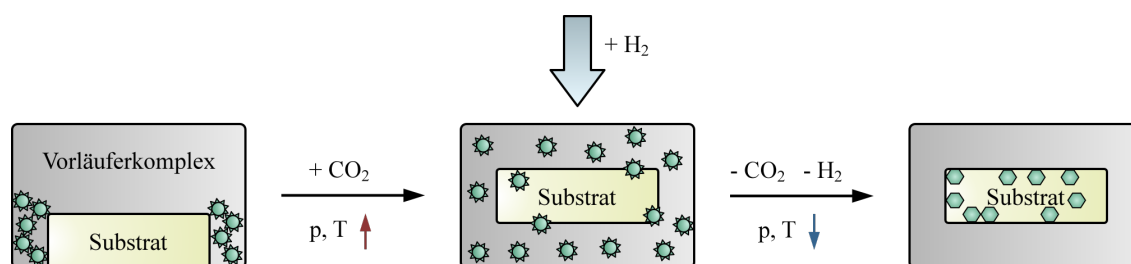


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung einzelner Prozessschritte im Verlauf des SFRD-Verfahrens [Zhang und Erkey, 2006].

Der Einsatz überkritischer Fluide („supercritical fluid“, SCF) bietet sich aufgrund ihres spezifischen physikochemischen Verhaltens an. Die Eigenschaften von SCFs wie Dichte, Viskosität und Diffusionsgeschwindigkeit können durch Variation des Drucks kontinuierlich verändert werden, so dass sich SCFs entweder wie ein Gas oder wie eine Flüssigkeit verhalten. Aufgrund der Kombination aus einer den Flüssigkeiten ähnlichen Dichte und einer den Gasen entsprechenden Viskosität stellen SCFs gute Lösungsmittel für organische und metallorganische Verbindungen

dar. Zudem erlauben sie durch ihre geringe Oberflächenspannung eine sehr gute Benetzung und Durchdringung von porösen Trägersubstanzen, welche der Abscheidung von NP dienen [Zhang und Erkey, 2006]. Kohlenstoffdioxid (sc-CO₂) wird dabei bevorzugt als SCF eingesetzt, da der kritische Punkt bereits bei einer Temperatur von 304,15 K und einem Druck von 7,38 MPa erreicht wird. Zudem ist CO₂ kostengünstig, ungiftig und hinterlässt keine Rückstände [Zhang und Erkey, 2006].

Der Nachteil des SFRD-Verfahrens liegt in der Unvoraussagbarkeit wichtiger NP-Charakteristika wie exakter Größe, Größenverteilung sowie Form der abgeschiedenen NP, was auf der Vielzahl an chemischen und physikalischen Parametern gründet, welche dieses Verfahren beeinflussen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Pt-NP wurden in einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen des KIT hergestellt. Die Partikel-Synthese erfolgte ausgehend von dem Vorläuferkomplex PtMe₂(COD), der mittels SFRD-Verfahren zu Pt-NP unterschiedlicher Durchmesser reduziert wurde. Der Vorläuferkomplex wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. S. Bräse (Institut für Organische Chemie, KIT) in einem dreistufigen Prozess aus Kaliumtetrachlorplatinat (K₂PtCl₄) synthetisiert. Neben PtMe₂(COD) wurden weitere strukturell ähnliche Vorläuferkomplexe mit unterschiedlicher Löslichkeit in sc-CO₂ hergestellt (siehe Abb. 2.23). Mit PtMe₂(COD) wurden allerdings die besten Umsetzungsergebnisse erzielt.

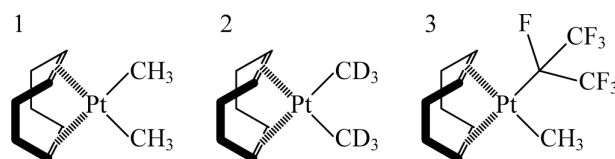


Abbildung 2.23: Organometallische Vorläufer zur Synthese von Pt-NP mittels SFRD-Verfahren. 1) Dimethyl- η^4 -(1,5- Cyclooctadien)platin(II) [Pt(d₃-Me₂)(COD)], 2) Dimethyl- η^4 -(1,5- Cyclooctadien)platin(II) [Pt(d₃-Me₂)(COD)], 3) Methyl- η^4 -(1,5-Cyclooctadien)-perfluor(*i*-propyl)platin [Pt(Me)(*i*-C₃F₇)(COD)].

Die Partikel-Synthese mithilfe des SFRD-Verfahrens wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Türk (Institut für Technische Thermodynamik und Kältetechnik, KIT) durchgeführt. Zunächst wurde der in sc-CO₂ lösliche molekulare Vorläufer mit dem unlöslichen Trägermaterial β -Cyclodextrin (β -CD) „physikalisch“ vermischt und nachfolgend für 20 Stunden bei 353 K (31 °C) und 15,5 MPa mit sc-CO₂ versetzt. Im Anschluss wurde der Vorläuferkomplex durch Hydrogenolyse gespalten, indem dem Reaktionsbehälter die dreißig-fache Menge an H₂ zugeführt wurde. Durch Druckerniedrigung wurden anschließend Komplexliganden und Lösungsmittel entfernt, so dass ein reines mit Pt-NP beladenes Substrat zurückblieb. Die Reduktion von PtMe₂(COD) zu Pt⁰-NP ist in Abb. 2.24 als Reaktionsgleichung dargestellt.

Durch Variation der Versuchsbedingungen gelang es zudem, Pt-NP verschiedener Größenbereiche herzustellen, die im Anschluss an die Herstellung mittels elektronenmikroskopischer Analysen bestimmt wurden. Zur Herstellung von Pt-NP < 100 nm wurden Vorläuferkomplex und Trägermaterial in zwei separate offene Behälter innerhalb des Hochdruckreaktors gegeben, während Pt-NP < 20 nm ausgehend von einer im gleichen Behälter befindlichen physikalischen Mischung

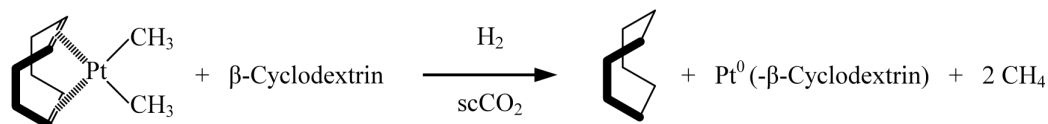


Abbildung 2.24: Reduktion des 1,5-Cyclooctadiendimethylplatinkomplexes $\text{PtMe}_2(\text{COD})$ zu $\text{Pt}^0\text{-NP}$.

aus $\text{PtMe}_2(\text{COD})$ und $\beta\text{-CD}$ synthetisiert wurden. Durch Reduktion von $\text{PtMe}_2(\text{COD})$ unter Atmosphärendruck wurde die Synthese von $\text{Pt-NP} > 100 \text{ nm}$ erzielt. In allen Experimenten betrug das Massenverhältnis von $\text{PtMe}_2(\text{COD})$ zu $\beta\text{-CD}$ konstant 0,023. $\beta\text{-CD}$ wurde aufgrund seiner toxikologischen Unbedenklichkeit als Trägermaterial gewählt [Pelka et al., 2009]. Struktur und schematische Darstellung von $\beta\text{-CD}$ sind in Abb. 2.25 zu sehen.

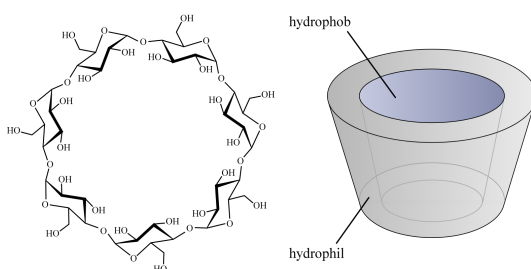


Abbildung 2.25: Struktur und schematische Darstellung von $\beta\text{-CD}$.

2.9.3 Anwendungsgebiete von Pt bzw. Pt-NP

Pt findet in Form von Platinschwämmen, als Suspension oder auf inerten Trägern (Al_2O_3 , SiO_2 , Aktivkohle, Zeolithe etc.) aufgezogen, vornehmlich Verwendung als Katalysator. So werden die katalytischen Eigenschaften von Pt zur großtechnisch durchgeführten Oxidation von Ammoniak zu Salpetersäure (Oswaldverfahren), in der Benzinraffination sowie in der Automobilindustrie zur Reinigung von Kraftfahrzeugabgasen genutzt [Reher und Rüdell, 2004; Zhong et al., 2004]. Durch Verkleinerung der Pt-Partikel in den nanoskaligen Bereich sowie durch Entwicklung neuer NP-Legierungen wird die katalytische Effizienz zunehmend gesteigert [Cao, 2004; Zhong et al., 2004]. Daneben findet Pt Anwendung in Brennstoffzellen, als H_2 -Speicher oder in Dentallegierungen [Dott et al., 2002] und wird zudem in Form von cis-Platin oder Carboplatin als Zytostatikum in der Krebstherapie eingesetzt [Voigt et al., 2006].

2.9.4 Toxikologische Betrachtung von Pt^0 , $\text{Pt}^0\text{-NP}$ und Pt-Verbindungen

In Anbetracht der durch den weitläufigen Einsatz von Pt in Katalysatoren bedingten Freisetzung dieses Elements in die Umwelt sowie der steten Verkleinerung von Pt-Partikel zur Steigerung der katalytischen Effizienz ist eine toxikologische Beurteilung dieses Materials unerlässlich geworden. Insbesondere aufgrund der neuartigen Eigenschaften nanoskaliger Materie im Vergleich zum makrostrukturierten Pendant gilt es, von Grund auf neue Betrachtungen anzustellen bzw.

veränderte toxikologische Zusammenhänge zu erwägen. So wurden bislang bereits einige Studien durchgeführt, die sich mit der toxikologischen Relevanz von nanostrukturiertem Platin hinsichtlich Exposition und den daraus folgenden gesundheitlichen Wirkungen befassen.

2.9.4.1 Betrachtungen zur Exposition

Die ambiente Freisetzung von Pt aus natürlichen Quellen findet aufgrund seiner Seltenheit (76. Stelle der Elementhäufigkeit, $5 \times 10^{-7}\%$) und seines inerten Charakters lediglich in einem geringen Umfang statt [Reher und Rüdél, 2004]. Der Eintrag von Pt in die Umwelt ist vordergründig auf dessen durch strömungsmechanische und thermische Belastungen hervorgerufene Emission aus Dreiwegekatalysatoren zurückzuführen. Mit deren verstärktem Einsatz in Kraftfahrzeugen seit den 1980er Jahren ist ein steigender Gehalt an PGE, und somit auch an Pt, in der Umwelt zu verzeichnen. Untersuchungen zufolge werden pro gefahrenem Kilometer zwischen 10 - 100 ng Pt freigesetzt [Koller, 2004]. Dabei sind straßennahe Gebiete grundsätzlich stärker belastet als ländliche [Gomez et al., 2002]. So wurden im Straßenstaub stark frequentierter Gebiete Pt-Konzentrationen von 31 - 420 ng/g Staub ermittelt [Whiteley und Murray, 2003]. In Anbetracht der hohen Pt-Gehalte (Pt-Lagerstätten weisen lediglich das Drei bis Zehnfache dieser Konzentrationen auf) wird sogar von einem Recycling dieses Elements aus kontaminierten Umweltkompartimenten gesprochen [Ely et al., 1999].

Eine Studie von Artelt et al. (1999) zur Größenverteilung der emittierten Pt-Partikel zeigte einen 62 - 67 %-igen Anteil an inhalierbaren Partikeln ($> 10,2 \mu\text{m}$). Die bronchialgängige Fraktion ($3,14 - 10,2 \mu\text{m}$) ergab einen Anteil von 19 - 27 %, während der Gehalt der alveolengängigen Fraktion ($< 3,14 \mu\text{m}$) bei 11 - 15 % lag (davon 6 % mit einem aerodynamischen Durchmesser von ca. $0,3 \mu\text{m}$). Dabei konnte unter den freigesetzten Platinspezies vornehmlich elementares Pt (Pt^0) identifiziert werden [Artelt et al., 1999]. Daneben wurden zu einem geringen Teil (etwa 1 %) auch lösliche Pt-Spezies (Pt (IV)) festgestellt [Artelt et al., 1999].

Eine weitere potentielle Quelle stellen Industrieanlagen, in denen Pt-haltige Katalysatoren eingesetzt werden, dar. Daten zu Pt-Gehalten in Industrieabluft und -stäuben liegen allerdings nicht vor [Reder und Rüdél, 2004].

Die Kontamination mit Pt bleibt jedoch nicht nur auf den unmittelbaren Straßen- oder Industriebereich beschränkt, sondern wird mit dem Wind und dem Abflusswasser der Straßen und Industrieanlagen auch in angrenzende Umweltkompartimente eingetragen [Laschka et al., 1996]. Im Regenwasser konnte eine gegenüber natürlichen Werten sechsfach höhere Belastung festgestellt werden ($1,12 \mu\text{g/l}$ im Vergleich zu $0,2 \mu\text{g/l}$). Untersuchungen von straßennahen Böden ergaben Pt-Gehalte von 64-73 ng/g [Ely et al., 2001]. Zudem konnte ein messbarer Transfer von Pt aus kontaminierter Umgebung (Luft und Boden) in Pflanzen festgestellt werden. Studien von Djingova et al. [2003] und Lustig et al. [1997a] haben eine Pt-Belastung diverser Pflanzenproben (Weidegras, Löwenzahn etc.) [Djingova et al., 2003] und Nutzpflanzen (Zwiebel, Rettich, oder Mais) [Lustig et al., 1997a] nachgewiesen. Auch hier lagen die Gehalte in den Städten (bis zu 30 ng Pt/g Staub) jeweils signifikant höher als in ländlichen Gebieten (bis zu $2,5 \text{ ng Pt/g Staub}$)

[Djingova et al., 2003]. Zudem konnte die Bioverfügbarkeit von Pt in aquatischen Organismen nachgewiesen werden [Zimmermann et al., 2002], wozu u.a. auch Krankenhäuser durch den Einsatz von Zytostatika beitragen. So gelangen allein durch Krankenhausabwässer jährlich ca. 15 kg Pt (Gesamt: 100 - 400 kg) in die Umwelt [Kümmerer et al., 2009], wovon 75 % dem hochaktiven Monoaquacisplatin zugerechnet werden. Insgesamt betrachtet, lässt sich nach den vorliegenden Daten eine Akkumulation dieses Elements in der Nahrungskette nicht ausschließen.

Allerdings sind bei der Diskussion der Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation von Pt die verschiedenen Eintragspfade und Eintragsformen zu beachten. Bei dem Eintrag von Pt aus Krankenhaus- und Industrieabwässern handelt es sich größtenteils um gelöste Pt-Verbindungen, welche sich hinsichtlich ihrer Löslichkeit, Mobilität und Sorption sowie Toxizität gegenüber Pt-Verbindungen, die aus Fahrzeugemissionen stammen, unterscheiden [Kümmerer et al., 1999]. In diesem Zusammenhang konnten Lustig et al. [1998] jedoch nachweisen, dass sich die Löslichkeit von Pt-Partikeln mit abnehmendem Partikeldurchmesser erhöht. So konnten Pt-NP (5 - 20 nm) im Vergleich zu Pt-Partikeln eines Durchmessers von ca. 20 µm durch natürliche Komplexbildner wie Huminstoffe deutlich besser gelöst werden.

Angesichts der nachgewiesenen Exposition des Menschen gegenüber Pt sowie einer möglicherweise verbesserten Bioverfügbarkeit dieses Materials in nanoskaliger Form, ergeben sich Fragestellungen bezüglich eventuell vorhandener nachteiliger Wirkungen auf die menschliche Gesundheit.

2.9.4.2 *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen zum toxikologischen Potential von Pt⁰ in makro- und nanostrukturierter Form sowie weiterer Pt-Spezies

Pt⁰ und Pt⁰-NP Pt⁰ in makrostrukturierter Form wird als toxikologisch unbedenklich eingestuft (Maximale Arbeitsplatzkonzentration, MAK-Wert: 1 mg/m³) [Marquardt und Schäfer, 2004]. Die orale Verabreichung von Pt-Partikeln eines Durchmessers von 1 - 5 µm zeigte lediglich geringe toxische Effekte in Form von nekrotischen Veränderungen im Epithel des GIT. Nach 24 h wurde ein wesentlicher Teil der Pt-Partikel über die Fäces ausgeschieden [Artelt et al., 1998]. Die geringe akute Toxizität liegt in der geringen Löslichkeit und Inertheit dieses Materials begründet [Reher und Rüdell, 2004].

Mit Verkleinerung des Durchmessers in den nanoskaligen Bereich nimmt jedoch die Löslichkeit und somit die Bioverfügbarkeit von Pt-Partikeln zu. Dies konnte von Artelt et al. [1998] anhand einer Studie mit Pt-Partikeln unterschiedlichen Durchmessers gezeigt werden. Während sich 200 - 600 nm große Partikel zu lediglich 0,001 % lösten, zeigten Pt-NP eines Durchmessers von 25 nm bereits eine Löslichkeit von 1,4 %. Durch den Einsatz 3 nm großer Partikel konnte die Löslichkeit bis auf 22 % gesteigert werden. Zudem konnten Artelt et al. [1999] in einer *in vivo* Studie an Ratten eine 30 %-ige Bioverfügbarkeit inhalierter Pt-Modellpartikel nachweisen, welche sich nach systemischer Verteilung in Leber, Nieren und Knochen anreicherten. Auch eine Bindung des Pt an Makromoleküle konnte festgestellt werden.

Eine zelluläre Aufnahme unterschiedlicher Pt-Partikel konnte in Untersuchungen von Zeller [2004] und Hartwig et al. [2002] beobachtet werden. Anhand von Pt⁰-Partikeln eines Durchmessers von

0,2 - 6 μm sowie Katalysatormodellpartikeln mit einem Durchmesser von 1 μm konnte in A549-Zellen (humane Lungenzellen) die Bildung von DNA-Addukten nachgewiesen werden. Die Entstehung dieser Metall-Addukte war konzentrations- und zeitabhängig und korrelierte zudem invers mit dem Durchmesser der eingesetzten Pt-Partikel [Hartwig et al., 2002; Zeller, 2004]. Hinsichtlich des Wirkmechanismus von Pt-Partikeln wird vermutet, dass diese durch ihre Komplexbildungseigenschaften mit Hydroxyl-, Amino- und Thiolgruppen biologischer Moleküle Wechselwirkungen eingehen und so zelluläre Abläufe stören. Eine weitere Annahme ist, dass es nach der zellulären Aufnahme von Pt-Partikeln zur Freisetzung oxidierter Pt-Spezies kommt, woraus die Modulation zellulärer Bestandteile und Abläufe resultiert. Auf diese Annahme stützen sich die Ergebnisse einer Studie von Asharani et al. [2010], welche die DNA-schädigenden Eigenschaften der von ihnen untersuchten Pt-Partikel eines Durchmessers von 5 - 8 nm mit der Freisetzung von Pt^{2+} begründen. Dabei wird die beobachtete Modulation der DNA-Integrität von einer Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 sowie einem Zellzyklusarrest begleitet [Asharani et al., 2010]. Zudem konnte in dieser Studie eine Induktion der ROS-Bildung sowie eine Apoptose-Induktion durch die untersuchten Pt-NP festgestellt werden.

Daneben existieren Untersuchungen, welche keinen durch Pt-NP verursachten Anstieg des zellulären ROS-Gehalts feststellen [Elder et al., 2007]. Vielmehr werden Pt-NP Eigenschaften von Radikalfängern zugeschrieben. So berichten u.a. Onizawa et al. [2009], Zhang et al. [2010] und Watanabe et al. [2009] von einem Einsatz funktionalisierter Pt-NP als Schutz gegenüber oxidativem Stress in der Zelle.

Insgesamt betrachtet, ist die Anzahl an Studien, welche sich mit dem toxikologischen Potential von Pt-NP befassen, bislang noch begrenzt. Vor allem Untersuchungen hinsichtlich zellulärer Aufnahmemechanismen sowie der Biokinetik von Pt sind kaum zu finden.

Platinverbindungen und -komplexe In Anbetracht einer möglichen Entstehung oxidierter Pt-Spezies nach der zellulären Aufnahme von Pt-Partikeln wird nachfolgend das toxikologische Potential von Pt-Verbindungen und -Komplexen kurz dargestellt.

Die Toxizität von Platinverbindungen wird vornehmlich durch ihre Löslichkeit bestimmt, so dass schlecht lösliche Verbindungen wie PtO_2 oder PtCl_2 im Vergleich zu gut löslichen wie PtCl_4 und $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ ein geringeres toxikologisches Potential aufweisen. In Untersuchungen an Lungenepithelzellen mit PtCl_4 und $\text{Pt}(\text{NO}_3)_2$ wurden zytotoxische Wirkungen dieser Verbindungen in Konzentrationen $< 0,4 \text{ mmol/l}$ festgestellt, wobei sich Pt(IV) als toxischer herausstellte. Auch in Studien zur Induktion von ROS besaß PtCl_4 mit einem Anstieg des ROS-Gehalts auf 1134 % die höchste Effektivität [Schmid et al., 2007], was vermutlich mit der starken Oxidationskraft von Pt(IV)-Verbindungen zusammenhängt. Daneben konnte durch Pt-Verbindungen in Abhängigkeit ihrer Oxidationsstufe eine Induktion von Mikrokernen sowie eine DNA-strangbrechende Wirkung festgestellt werden [Migliore et al., 2002]. Nicht zuletzt werden Pt-Verbindungen nephrotoxische Wirkungen zugeschrieben, die im Fall von PtCl_4 mit denen von Cis-Diammindichloroplatin(II) (Cis-Pt) vergleichbar sind [Lenz, 2006].

Der planare Komplex Cis-Pt wirkt mutagen und im Tierversuch auch karzinogen. Eine embryotoxische und teratogene Wirkung wurde ebenfalls nachgewiesen [Kümmerer et al., 2009]. Cis-Pt wird seit den 70er Jahren zur Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzt. Cis-Pt wird nach Verabreichung innerhalb von 24 h zu 30 - 70 % ausgeschieden [Ott und Gust, 2006]. Die Verweildauer in den einzelnen Organen ist unterschiedlich, wobei die Niere an erste Stelle steht, gefolgt von Leber und Lunge. Im Zielgewebe hydrolysiert der Komplex im Zellinneren, worauf er positiv geladen vorliegt und folglich an Nukleophile wie die DNA-Basen bindet. Dabei bilden sich bevorzugt 7-*N*-Guanin-Addukte aus. Zudem treten sowohl Intra- als auch Interstrang- sowie Protein- und DNA-Proteinverknüpfungen auf. Durch Hemmung der DNA-Transkription sowie der Proteinbiosynthese wird die Zelle schließlich in die Apoptose geführt [Voigt et al., 2006; Ott und Gust, 2006]. Diese zytotoxischen Eigenschaften werden sowohl planaren als auch oktaedrischen Pt-Komplexen zugeschrieben, wobei die Wirksamkeit letzterer geringer ist. Unter den planaren Komplexen sind in der Regel Cis-Isomere effektiver als Trans-Komplexe [Cepeda et al., 2007; Saito et al., 1997].

Kapitel 3

Ziel der Arbeit

Im Mittelpunkt toxikologischer Bewertungen nanostrukturierter Materie stand bislang vornehmlich das von einer Inhalation ausgehende Gesundheitsrisiko, wohingegen mögliche Auswirkungen nach deren oraler Aufnahme in geringem Maße betrachtet wurden [Xia et al., 2004]. Aus nachfolgend aufgeführten Gründen besteht jedoch die Notwendigkeit derartiger Untersuchungen: Zum Einen ist mit einem stetig wachsenden Einsatz nanostrukturierter Materie im Lebensmittelsektor in Form von Lebensmittel-Zusatzstoffen und Verpackungsadditiven zu rechnen [Knebel und Widmer, 2009], zum Anderen ist es denkbar, dass Nanomaterialien durch ihren Eintrag in Wasser und Boden in der Nahrungskette akkumulieren. Nicht zuletzt besteht die Möglichkeit, dass nanoskalige Partikel nach deren Aufnahme über den Respirationstrakt infolge des mukoziliären Abwehrmechanismus verschluckt werden [Kreyling et al., 2006], womit auch eine Inhalation zu einer Exposition des Gastrointestinaltrakts (GIT) gegenüber nanostrukturierter Materie führen kann.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher der Frage nachgegangen werden, inwieweit Nanomaterie in Zellen des GIT einzudringen und mit zellulären Strukturen zu interagieren vermag. Als Testmaterialien wurden einwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs) und metallische Platin-Nanopartikel (Pt-NP) gewählt. Die Immission dieser Nanomaterialien sowie deren Bioverfügbarkeit in Organismen der Nahrungskette konnten bereits mehrfach nachgewiesen werden [Djingova et al., 2003; Lustig et al., 1997a; Oberdörster et al., 2005c; Zimmermann et al., 2002]. Hierbei ist aufgrund der zunehmenden Relevanz von nanostrukturierter Materie für die technologische Entwicklung ein ansteigender Trend zu erwarten. Zudem gewinnt die Ingestion von CNTs durch deren Einsatz als Additiv in Verpackungsmaterialien und den damit einhergehenden Kontakt zum Lebensmittel zunehmend an Bedeutung [Sozer und Kokini, 2009].

Die Untersuchungen wurden exemplarisch an der gut charakterisierten humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt. Der Fokus lag dabei auf der Erfassung möglicher zytotoxischer Wirkungen, einer Modulation des zellulären Redoxstatus sowie der Beeinflussung redox-sensitiver zellulärer Signalwege und der DNA-Integrität. Damit sollte diese Arbeit dazu beitragen, mögliche „sensitive“ Biomarker eines toxischen Potentials dieser Nanostrukturen auf zellulärer und molekularer Ebene zu identifizieren.

Den biologischen Untersuchungen wurde eine eingehende Charakterisierung des Testmaterials vorangestellt, da aus der Literatur bekannt ist, dass die biologische Aktivität nanostrukturierter Materie maßgeblich durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmt wird [Müller et al., 2008]. Hierzu wurde ein Spektrum an physikalischen bzw. analytischen Methoden, darunter ICP-MS, Raman-Spektroskopie, Rasterkraftmikroskopie sowie diverse elektronenmikroskopische Methoden, herangezogen, welche die Erfassung wirkungsbestimmender Eigenschaften wie Größenverteilung, Agglomerations-, Reinheitsgrad u.a. ermöglichen. Hiermit sollten, als weiterer Gesichtspunkt dieser Arbeit, mögliche Zusammenhänge zwischen den Charakteristika des jeweiligen Nanomaterials und der Zellantwort aufgezeigt werden. Elektronenmikroskopische Methoden wurden ebenso für die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme der Nanomaterialien eingesetzt, insbesondere auch, da diese die subzelluläre Lokalisation des Testmaterials erlauben. Hinsichtlich zytotoxischer Wirkungen der SWCNTs und Pt-NP wurde eine Kombination verschiedener Testverfahren angewandt, welche die Unterscheidung zwischen wachstumsbeeinflussenden Effekten und Veränderungen der mitochondriellen Aktivität sowie der Integrität der Zellmembran ermöglichen. Damit sollte zum Einen ein erweitertes Bild über das zytotoxische Potential der Testmaterialien gewonnen und zum Anderen dessen Fehleinschätzung durch falsch positive bzw. negative Ergebnisse, die durch Interferenzen zwischen den Nanostrukturen und den Untersuchungsmaterialien entstehen können, möglichst vermieden werden.

Die Induktion von oxidativem Stress wird als Schlüsselereignis der biologischen Wirkungen von nanostrukturierter Materie angesehen [Donaldson et al., 2005; Mühlfeld et al., 2008; Unfried et al., 2007]. Dabei können diese durch oberflächenkatalytische Prozesse sowie eine direkte Interaktion mit subzellulären Strukturen zur Generierung von ROS beitragen [Unfried et al., 2007]. Ausgehend davon wurden die Testmaterialien auf eine den zellulären ROS-Gehalt modulierende Wirkung untersucht. Als weitere Anhaltspunkte für eine Beeinflussung der Redox-Homöostase von HT29-Zellen wurden die Aktivierung des „nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“ (Nrf2) Signalwegs sowie der intrazelluläre Glutathion(GSH)-Status betrachtet. Während durch eine Aktivierung des Nrf2-Signalwegs die Expression detoxifizierender Enzyme des Phase II-Metabolismus induziert wird, ist GSH als zelluläres Antioxidans direkt in die Entgiftung elektrophiler Spezies, wie ROS, involviert [Forman et al., 2009].

Ein erhöhter ROS-Gehalt kann zu oxidativer Schädigung der DNA führen [Don Porto Carero et al., 2001; Dybdahl et al., 2004; Gurr et al., 2005]. Daneben sind Nanomaterialien in der Lage die DNA-Integrität der Zelle direkt zu beeinflussen [Unfried et al., 2007]. Vor diesem Hintergrund wurden die DNA-schädigenden Eigenschaften beider Nanomaterialien mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) bestimmt. Durch Variation der Versuchsbedingungen und dem Einsatz des DNA-Reparaturenzyms Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) sowie weiterer, für die Beurteilung des genotoxischen Potentials der Testmaterialien relevanter Untersuchungen (u.a. Induktion von Mikrokernen und Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53), sollten einerseits ein umfassenderes Bild über die Art des genetischen Schadens gewonnen und andererseits mögliche Wirkmechanismen gefunden werden.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs)

In Abschnitt 4.1.1 werden zunächst die Charakteristika der in dieser Arbeit eingesetzten SWCNTs beschrieben. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen vorgestellt und im Hinblick auf einen möglichen Wirkmechanismus unter Berücksichtigung des aktuellen Forschungsstands diskutiert.

4.1.1 Charakterisierung der untersuchten SWCNTs

Die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs wurden von Dr. F. Hennrich (Institut für Nanotechnologie, Forschungszentrum Karlsruhe) aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. Kappes (Karlsruher Institut für Technologie, KIT) hergestellt und freundlicherweise für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen bereitgestellt. Zur Herstellung der SWCNTs wurde die Methode der Laserablation herangezogen (siehe Abschnitt 2.8.2), bei der Graphitstäbe in einer beheizten Reaktionskammer durch einen Hochleistungslaser verdampft werden. Unter Einsatz der katalysierenden Übergangsmetalle Ni^0 und Co^0 (Dotierung der Graphitstäbe beträgt jeweils 1,2 Atomprozent) wird ein Ruß mit einem SWCNT-Anteil von ca. 50 wt.% gewonnen. Durch anschließende Dichtegradientenzentrifugation zur Beseitigung von Ruß- und Metallverunreinigungen ergibt sich ein SWCNT-Pulver mit einem Restgehalt an Ni^0 und Co^0 von 3,8 bzw. 3,1 wt.%. Dabei wird der Restmetallgehalt mittels Mikrowellenaufschluss und nachfolgender Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionenquelle („inductively coupled plasma mass spectrometry“, ICP-MS) bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.2).

SWCNTs neigen aufgrund starker van der Waals Kräfte dazu, in wässrigen Systemen Agglomerate zu bilden. Um in zellulären Systemen die Wirkung einzelner Röhren feststellen zu können, muss zunächst eine stabile SWCNT-Suspension mit einem möglichst niedrigen Anteil an SWCNT-Bündeln bzw. -Agglomeraten hergestellt werden. Hierzu wurde eine Auswahl aus der Literatur bereits bekannter grenzflächenaktiver Stoffe (sog. „surfactants“) auf ihre Eignung als Dispersions-

mittel für SWCNTs untersucht: Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumcholat (NaC), Amylose, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Lecithin, Gummi arabicum und β -Cyclodextrin.

Es wurden Suspensionen aus dem SWCNT-Pulver und den genannten Verbindungen hergestellt und der Dispersionsgrad der SWCNTs mittels Raman-/Fluoreszenz-Spektroskopie verglichen. Die Analysen wurden von Dr. F. Hennrich durchgeführt.

Die Raman-Spektroskopie stellt eine höchst empfindliche Analysenmethode zur Materialcharakterisierung dar. Nach Anregung der zu untersuchenden Materie mit monochromatischem Licht wird anhand eines sog. Raman-Spektrums ein einzigartiger „Fingerabdruck“ der Testsubstanz erstellt, welcher sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über das zu untersuchende Material erlaubt (siehe Abschnitt 5.3).

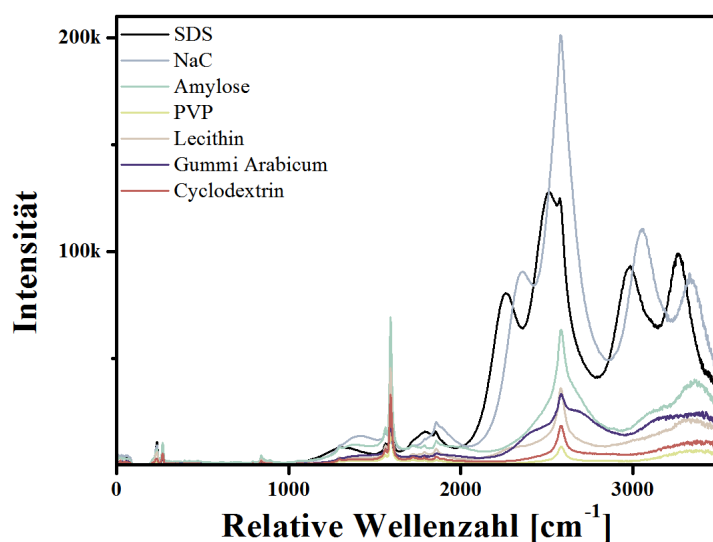


Abbildung 4.1: Raman Spektrum von SWCNTs dispergiert in Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumcholat (NaC), Amylose, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Lecithin, Gummi arabicum und β -Cyclodextrin (in Zusammenarbeit mit Dr. F. Hennrich).

Die Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. F. Hennrich (Institut für Nanotechnologie, Forschungszentrum Karlsruhe). Abbildung 4.1 zeigt die Raman-Spektren der einzelnen „surfactant“-SWCNT-Suspensionen im Vergleich, wobei die Intensität in Abhängigkeit der Energie, ausgedrückt als Wellenzahl [cm^{-1}], dargestellt ist.

Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 785 nm. In den Raman-Spektren aller Testsuspensionen sind deutlich die für SWCNTs charakteristischen Spitzen (sog. G-Moden) im Bereich zwischen 1500 und 1600 cm^{-1} zu erkennen. Darüber hinaus kann durch die Spitzen mit einer Raman-Verschiebung von 2000 - 4000 cm^{-1} auf das Vorhandensein von SWCNTs mit kleinen Durchmessern geschlossen werden. Ein Vergleich der Intensitäten beider Bereiche gibt darüber Aufschluss, inwieweit die SWCNTs als einzelne Röhren vorliegen, was die Dispergiereigenschaften der jeweiligen „surfactants“ aufzeigt. Dabei wird ersichtlich, dass insbesondere SDS und NaC aufgrund der hohen Raman-Intensitäten im Bereich 2000 - 4000 cm^{-1} für die Dispersion von

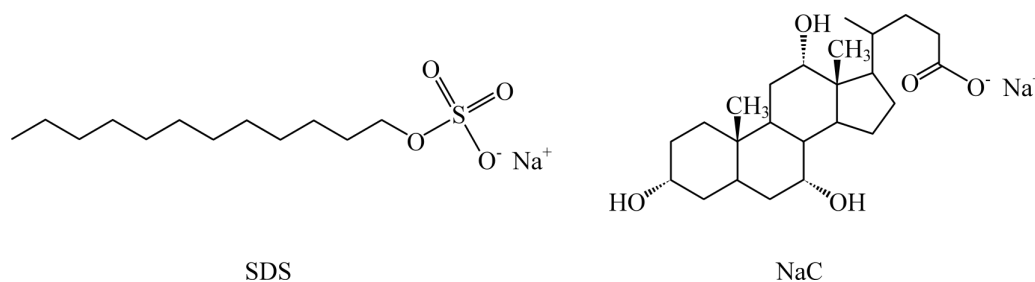


Abbildung 4.2: Struktur von „sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat, SDS) und Natriumcholat (NaC).

SWCNTs geeignet sind. Die chemische Struktur dieser beiden anionischen Tenside ist in Abb. 4.2 dargestellt.

Aus parallel durchgeführten Versuchen mit HT29-Zellen zur Zytotoxizität von SDS und NaC ging hervor, dass NaC bis zu einer Konzentration von 0,2 mg/ml zellkompatibel ist, während SDS bei dieser Konzentration deutliche zytotoxische Effekte verursacht (siehe Abb. 4.3, das prozentuale Zellwachstum der behandelten Proben ist in Bezug zur Kontrolle (Medium 10 % FKS) als „Test-over-control“ (T/C) dargestellt). Daher wurden für die biologischen Untersuchungen Suspensionen von SWCNTs in NaC mit einer Endkonzentration an NaC von 0,2 mg/ml (0,02 %) eingesetzt.

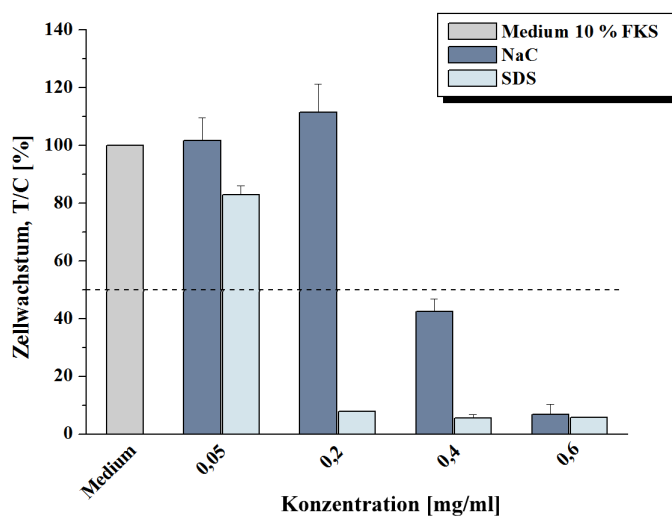


Abbildung 4.3: Einfluss von NaC und SDS (auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 72-stündiger Inkubation, bestimmt mittel des SRB-Assay. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von mind. drei unabhängigen Versuchen in einer Vierfachbestimmung in Relation zur 10 % FKS-haltigen Medium-Kontrolle (Wachstum = 100 %).

Durchmesser und Länge sowie der Agglomerationsgrad der mit NaC dispergierten SWCNTs wurden mittels Rasterkraftmikroskopie („atomic force microscopy“, AFM) bestimmt [Hennrich et al., 2007]. Hierzu wurden die SWCNTs auf einem Silikon-Träger fixiert und die Oberfläche durch eine an einer Blattfeder befestigten Spitze zeilenweise abgetastet. Aufgrund einer unterschiedlich starken Verbiegung der Blattfeder in Abhängigkeit der Oberflächenstruktur kann eine Größenver-

teilung des Untersuchungsmaterials ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4 dargestellt. Die Durchmesser bewegen sich zwischen 1 und 3,2 nm mit einer maximalen Häufigkeit bei 1,8 nm. Neben vereinzelt vorliegenden Bündeln von 2 - 3 Nanoröhren wurden hauptsächlich einzelne SWCNTs festgestellt. Die Längen der SWCNTs variieren zwischen 200 und 2000 nm, wobei das Maximum der Häufigkeitsverteilung bei etwa 530 nm liegt. Eine durchschnittliche Kohlenstoffnanoröhre der untersuchten Suspension besitzt somit einen Durchmesser von 1,8 nm und ist 530 nm lang.

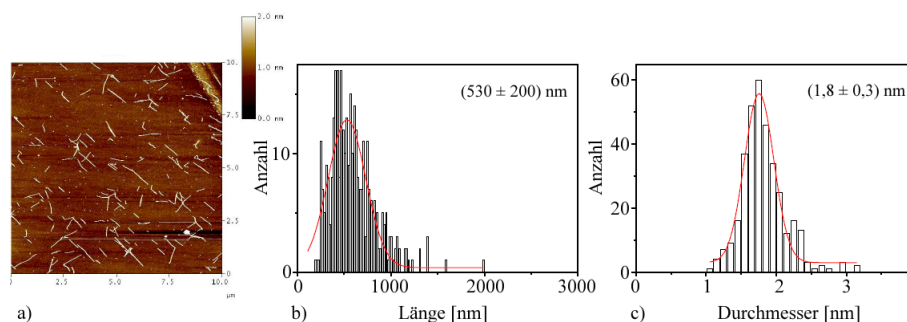


Abbildung 4.4: Durchmesser und Länge der in NaC dispergierten SWCNTs, bestimmt mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM). a) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme, b) Längenverteilung und c) Durchmesserverteilung (durchgeführt von Dr. F. Hennrich).

4.1.2 Zelluläre Aufnahme von SWCNTs

Die zelluläre Aufnahme und subzelluläre Lokalisation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SWCNTs in HT29-Zellen wurde mittels Raster (REM)- und Transmissions (TEM)-elektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurden die mit den Testpartikeln inkubierten Zellen mit Glutaraldehyd fixiert, zur Kontrastierung mit Osmiumtetroxid behandelt und nachfolgend entwässert (siehe Abschnitt 5.8). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Arbeitskreis von Prof. D. Gerthsen (Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Fakultät Physik, KIT) durchgeführt. Allerdings konnte mittels der genannten Methoden keine zelluläre Aufnahme der SWCNTs nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür ist die Schwierigkeit elektronenmikroskopisch kohlenstoffhaltige Nanostrukturen von aus Kohlenstoff bestehenden zellulären Strukturen zu unterscheiden. Des Weiteren können SWCNTs durch Kontrastierung mit Osmiumtetroxid überdeckt werden. Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs zudem mit einer Länge von 0,5 μm verhältnismäßig kurz sind, kann auch nicht aufgrund des im Vergleich zu zellulären Strukturen unterschiedlichen Erscheinungsbilds auf die Anwesenheit dieses Nanomaterials in der Zelle geschlossen werden. Daher bedarf es zur Visualisierung kohlenstoffhaltiger Nanomaterialien aufwändigerer Methoden. Eine Möglichkeit stellt die Inkorporierung von AgI in den Hohlraum der SWCNTs dar. Damit wird das Reflexionsvermögen der Nanoröhren gesteigert, während ihre Oberfläche chemisch unverändert bleibt [Porter et al., 2007]. Mittels Konfokalmikroskopie können diese dann intrazellulär lokalisiert werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die energiegefilterte Transmissionselektronenmikroskopie („energy filtered transmission electron microscopy“,

EFTEM) dar, welche eine deutliche Unterscheidung zwischen zellulären Kompartimenten und kohlenstoffhaltigen Nanostrukturen erlaubt. Aufgrund der problematischen Erfassung kohlenstoffhaltiger Nanostrukturen in zellulärer Matrix, existieren nur wenige Studien zur zellulären Aufnahme von SWCNTs. Dennoch konnten u.a. Porter et al. [2007] die Internalisierung dieses Nanomaterials sowie dessen subzelluläre Lokalisation mittels EFTEM nachweisen. Bezüglich des Aufnahmemechanismus der in der genannten Studie untersuchten SWCNTs konnten sowohl eine aktive Aufnahme mittels Phagozytose als auch eine freie Diffusion durch die Lipiddoppelschicht identifiziert werden [Porter et al., 2007]. Der Durchmesser der SWCNTs lag bei 0,9 - 1,2 nm, was der Größenordnung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Nanoröhren entspricht. Demnach ist eine zelluläre Aufnahme der hier getesteten SWCNTs anzunehmen.

4.1.3 Zytotoxische Eigenschaften von SWCNTs

Hinsichtlich zytotoxischer Wirkungen von SWCNTs wurde eine Kombination verschiedener Testverfahren herangezogen, die unterschiedliche biologische Endpunkte, wie Zellviabilität, Zellwachstum, mitochondrielle Enzymaktivität und Membranintegrität, erfassen. Hiermit soll eine Fehleinschätzung des zytotoxischen Potentials nanostrukturierter Materie durch falsch positive bzw. negative Ergebnisse, herrührend von möglichen Interferenzen zwischen Nano- und Untersuchungsmaterialien, vermieden werden. Des Weiteren soll durch die Erfassung zytotoxischer Eigenschaften zwischen einer substanzinduzierten und einer durch zytotoxische Effekte ausgelösten Zellantwort differenziert werden können.

4.1.3.1 Einfluss auf das Zellwachstum

Um den Einfluss der SWCNTs auf das Zellwachstum von HT29-Zellen zu untersuchen, wurde der Sulforhodamin B (SRB)-Assay durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Bestimmung des Lebendproteins mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffs SRB (siehe Abschnitt 5.10.2). Abbildung 4.5 zeigt die Ergebnisse der Inkubationen mit SWCNTs über Zeiträume von 24, 48 und 72 h.

Zur Auswertung wurden die Messwerte der mit SWCNTs behandelten Proben in Verhältnis zum Messwert der Kontrolle (NaC, Zellwachstum = 100 %) gesetzt und als prozentuales Zellwachstum („test-over-control“, (T/C)) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

Abbildung 4.5 zeigt, dass nach einer 24-stündigen Inkubation mit SWCNTs über den gesamten Konzentrationsbereich (0,00005 - 0,2 µg/ml) keine Beeinflussung des Zellwachstums durch das Nanomaterial zu beobachten ist. Wird die Expositionsdauer auf 48 h verlängert, tritt eine wachstumshemmende Wirkung ein, welche ab einer Konzentration von 0,05 µg/ml ($\hat{=}$ 11,7 ng/cm²) einsetzt und mit ansteigenden Konzentrationen zunimmt. In der höchsten gemessenen SWCNT Konzentration (0,2 µg/ml) beträgt das Zellwachstum nach einer 48-stündigen Exposition noch ca. (74 ± 5) % gegenüber der Kontrolle.

Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h führt ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Zellwachstums ab einer Konzentration von 0,05 µg/ml. Dabei wird

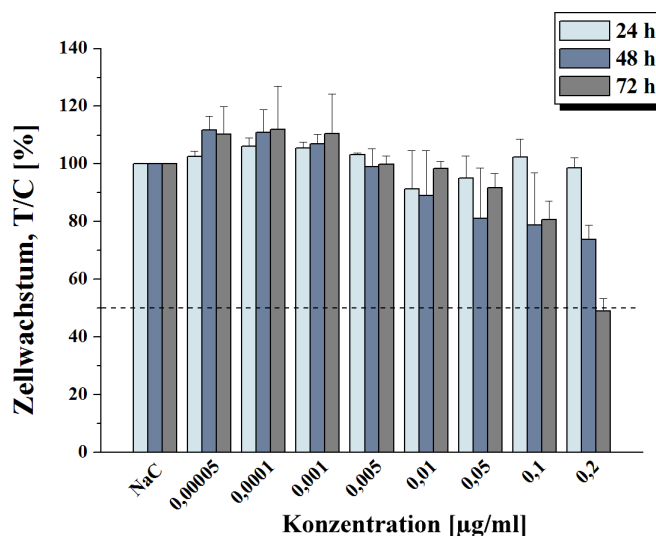


Abbildung 4.5: Einfluss von SWCNTs auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition, bestimmt mittels SRB-Assay (in Zusammenarbeit mit A. Rechel, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2009). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von mind. drei unabhängigen Versuchen in einer Vierfachbestimmung in Relation zur NaC-Kontrolle (0,02 %, Wachstum = 100 %). 0,1 µg/ml $\hat{=}$ 23,4 ng/cm².

bei einer SWCNT-Konzentration von 0,2 µg/ml eine Wachstumsrate von (49 ± 4) % gegenüber der NaC-Kontrolle erreicht (mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) = $(0,20 \pm 0,01)$ µg/ml; $(0,20 \pm 0,01)$ µg/ml $\hat{=}$ $(46,7 \pm 2,3)$ ng/cm²).

4.1.3.2 Einfluss auf die mitochondrielle Enzymaktivität

Zur Aktivitätsbestimmung mitochondrieller Dehydrogenasen wurde der WST-1-Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6). Das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) wird in vitalen Zellen durch mitochondrielle Dehydrogenasen zum dunkelroten Formazan umgesetzt. Die Menge an gebildetem Formazan gibt Aufschluss über die Vitalität der Mitochondrien und somit auch über die Viabilität der Zelle.

Als Positivkontrolle wurde Quercetin (500 µM, siehe Abb. 4.6) eingesetzt, das als potenter *in vitro* Zellwachstumshemmstoff beschrieben ist [Kern, 2006]. Abbildung 4.7 zeigt das Ergebnis einer 24-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs. Zur Auswertung wurden die Messwerte der SWCNT behandelten Proben auf den Messwert der Kontrolle bezogen (NaC, mitochondrielle Aktivität = 100 %) und als prozentuale mitochondrielle Enzymaktivität (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

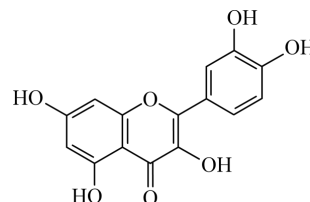


Abbildung 4.6: Struktur von Quercetin.

Wie in Abb. 4.7 zu sehen ist, lässt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen ab einer Konzentration von $0,05 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ $11,7 \text{ ng/cm}^2$) feststellen. Bei der höchsten Konzentration an SWCNTs ($0,2 \mu\text{g/ml}$ $\hat{=}$ $46,7 \text{ ng/cm}^2$) beträgt die Enzymaktivität nur noch $(72 \pm 9) \%$ gegenüber der Kontrolle. Die mitochondrielle Enzymaktivität der mit $500 \mu\text{M}$ Quercetin behandelten Zellen liegt im Bezug zur Kontrolle bei $(31 \pm 3) \%$ und ist damit deutlich vermindert.

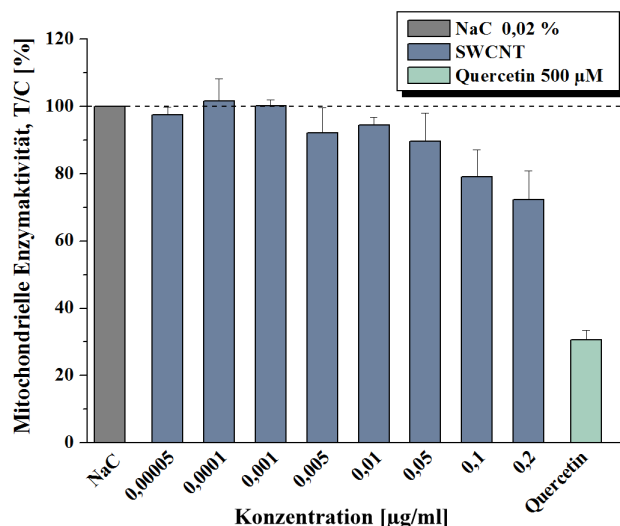


Abbildung 4.7: Einfluss von SWCNTs auf die mitochondrielle Aktivität von HT29-Zellen nach 24-stündiger Exposition, bestimmt mittels WST-1-Assay (in Zusammenarbeit mit A. Rechel, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2009). Quercetin ($500 \mu\text{M}$) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von mind. sechs unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung nach Ausreißerbereinigung (Nalimov) in Relation zur NaC-Kontrolle ($0,02 \%$, Mitochondrielle Enzymaktivität $= 100 \%$). $0,1 \mu\text{g/ml}$ $\hat{=}$ $23,4 \text{ ng/cm}^2$.

Um sicher zu stellen, dass die Untersuchungsergebnisse nicht auf einer Interaktion zwischen SWCNTs und dem Farbstoff beruhen, wurde der WST-1-Assay zusätzlich im zellfreien System unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Ergebnis hat gezeigt, dass die Absorption bei einer Kombination aus SWCNTs und dem Farbstoff über den gesamten Konzentrationsbereich unverändert bleibt, womit eine Interaktion zwischen den beiden Komponenten ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt).

4.1.3.3 Einfluss auf die Membranintegrität der Zelle

Die Untersuchung des Einflusses von SWCNTs auf die Integrität der Zellmembran erfolgte anhand des LDH-Assays (siehe Abschnitt 5.10.4). Hierbei wurde die Aktivität des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand des Zellkulturmediums bestimmt. Bei Zellen mit intakter Membran ist LDH nicht nachweisbar, wohingegen es bei einer Schädigung der Zellmembran in das die Zellen umgebende Medium austritt und infolgedessen erfasst werden kann. Der Nachweis erfolgt über die Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes zu Formazan, die an

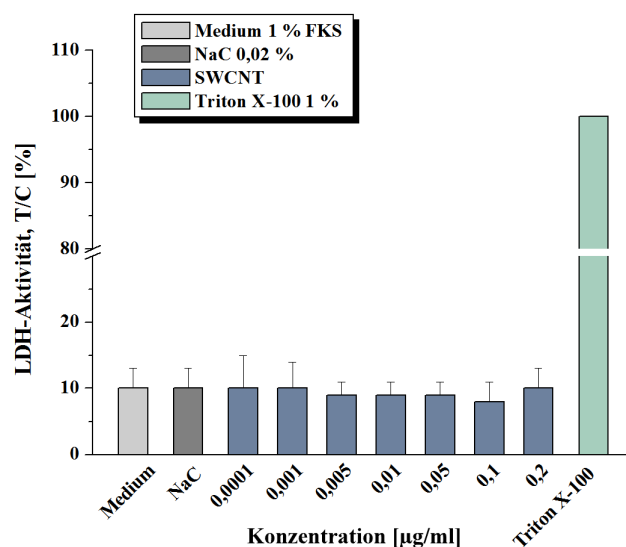


Abbildung 4.8: Einfluss von SWCNT auf die Integrität der Zellmembran von HT29-Zellen nach 24-stündiger Exposition, bestimmt mittels LDH-Assay. Triton X-100 (1 %) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von vier unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung nach Ausreißerbereinigung (Nalimov) in Relation zur Positivkontrolle (Triton X-100 (1 %), LDH-Aktivität = 100 %). Die Inkubation wurde in 1 % FKS-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt. $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,36 \text{ ng/cm}^2$.

eine LDH-katalysierte Reaktion gekoppelt ist. In Abb. 4.8 ist das Ergebnis einer 24-stündigen Inkubation mit SWCNTs gezeigt. Alle Inkubationen wurden in 1 % FKS-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt, da 10 % FKS hohe Mengen an LDH enthält und ein starkes Hintergrundsignal hervorrufen würde. Als Positivkontrolle wurde der Mediumüberstand von Zellen eingesetzt, die mit Triton X-100 behandelt wurden (siehe Abb. 4.9). Triton X-100 ist ein mildes und relativ schwach denaturierendes Detergenz, das Proteine aus der Membran lösen kann und dabei die Enzymfunktion aufrecht erhält [Wang et al., 2008].

Zur Auswertung wurde die Positivkontrolle (Triton X-100, 1%) auf 100 % LDH-Aktivität normiert und die Messwerte der SWCNT und NaC behandelten Proben darauf bezogen. Die LDH-Aktivität im Überstand des Zellkulturmediums behandelter Proben ist als (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen (siehe Abb. 4.8).

Das Ergebnis des LDH-Assays zeigt, dass nach 24-stündiger Exposition von HT29 Zellen gegenüber SWCNTs im Vergleich zur Positivkontrolle über den gesamten Konzentrationsbereich (0,00005 - 0,2 µg/ml) lediglich eine geringe Menge an LDH im Überstand des Zell-

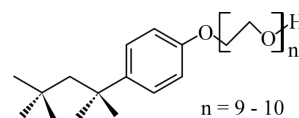


Abbildung 4.9: Struktur von Triton X-100.

kulturmediums zu messen ist. Auch der Vergleich der Mediumüberstände SWCNT-behandelter Proben und der Medium- und NaC-Kontrolle zeigt keine signifikanten Unterschiede der LDH-Aktivität im Mediumüberstand. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass SWCNTs die

Integrität der Zellmembran von HT29-Zellen nicht beeinflussen.

4.1.3.4 Zusammenfassung und Diskussion der zytotoxischen Eigenschaften von SW-CNTs

Zellviabilität, mitochondrielle Enzymaktivität und Membranintegrität der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurden nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber SWCNTs ($\emptyset$: 1 nm, Länge: 0,5 μ m) insgesamt nur in geringem Maße beeinflusst. Es war weder eine Abnahme der Zellviabilität noch eine Schädigung der Zellmembran festzustellen (siehe Abb. 4.5 und 4.8). Auch im Trypanblau-Ausschluss, der parallel zu den Versuchen des Comet Assays und Bestimmung des tGSH-Gehalts durchgeführt wurde, war nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber SWCNTs keine Viabilitätsabnahme der HT29-Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Jedoch wurde die Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen ab einer Konzentration von 0,05 μ g/ml ($\hat{=}$ 11,7 ng/cm²) beeinträchtigt (siehe Abb. 4.7). Nach Inkubation mit der höchsten getesteten Konzentration betrug die Enzymaktivität in den Mitochondrien 73 % gegenüber der Kontrolle. Dies bedeutet, dass nach 24-stündiger Inkubation mit SWCNTs der Stoffwechsel der Zellen bereits beeinflusst wurde. Eine das Zellwachstum hemmende Wirkung, welche u.a. durch den Funktionalitätsverlust der Mitochondrien bedingt sein kann, trat nach längerer Exposition von HT29-Zellen gegenüber SWCNTs ein. So waren wachstumshemmende Effekte sowohl nach 48 h als auch nach 72 h zu beobachten (siehe Abb. 4.5). Dabei nahmen diese jeweils ab einer Konzentration von 0,05 μ g/ml konzentrationsabhängig und mit zunehmender Expositionsdauer zu. Nach 72-stündiger Exposition verringerte sich die Wachstumsrate der HT29-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von (0,20 $\pm$ 0,01) μ g/ml ($\hat{=}$ (46,7 $\pm$ 2,3) ng/cm²) auf 50 % gegenüber der Kontrolle.

Mitochondrien wurden bereits in zahlreichen Studien als Zielorganelle für nanostrukturierte Materie identifiziert [Jia et al., 2005; Li et al., 2003; Hussain et al., 2005; Xia et al., 2006; Zhu et al., 2006]. Sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Studien konnte eine Lokalisation von CNTs innerhalb der Mitochondrien mit einer Schädigung der Strukturen dieser Organellen in Verbindung gebracht werden [Oberdörster et al., 2005a; Zhu et al., 2006].

So konnten Yang et al. [2009] in embryonalen Fibroblasten der Maus („primary mouse embryo fibroblast“, PMEF-Zellen) nach 24-stündiger Exposition mit SWCNTs ($\emptyset$: 8 nm, Länge: < 5 μ m) ebenfalls einen Rückgang der mitochondriellen Aktivität mittels WST-1-Assay nachweisen. Dieser erstreckte sich über den gesamten Konzentrationsbereich von 5 - 100 μ g/ml. In der höchsten Konzentration war die Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen um 25,9 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle erniedrigt, was im Größenbereich der in der vorliegenden Arbeit festgestellten Aktivitätsabnahme liegt. In den Untersuchungen von Yang et al. [2009] wurden jedoch weitaus höhere Konzentrationen eingesetzt (5 - 100 μ g/ml). Die Abweichung in der Dosis-Wirkung-Beziehung könnte auf die Unterschiede hinsichtlich der Dimensionen der SWCNTs sowie der untersuchten Zelllinien zurückzuführen sein. Veränderungen der Funktionalität von Mitochondrien und die daraus resultierende Zytotoxizität von CNTs und dem C₆₀-Fulleren wurden ebenso in einer Studie von Jia et al. [2005] anhand von Untersuchungen mit Alveolarma-

krophagen festgestellt. Dabei sind SWCNTs als das zytotoxischste Nanomaterial hervorgegangen, gefolgt von MWCNTs und dem C₆₀-Fulleren. Des Weiteren wurde von einer Beeinflussung der mitochondrialen DNA (mtDNA) durch SWCNTs berichtet [Li et al., 2007a].

Es wird angenommen, dass eine Interaktion zwischen nanostrukturierter Materie und mitochondrialen Strukturen Einfluss auf den mitochondrialen Elektronenfluss bzw. -verlust nimmt. Als Folge davon werden von diesen Organellen vermehrt ROS gebildet, was wiederum zu einer oxidativen Schädigung des mitochondrialen Genoms führen kann. Da die mtDNA für die Mehrzahl der Proteinkomponenten der mitochondrialen Elektronentransportkette kodiert, wird die Mutagenese der mtDNA mit Veränderungen des Elektronenflusses in Verbindung gebracht. Auf diese Weise entsteht eine positive Rückkopplung, die einen sukzessiven Funktionsverlust dieser subzellulären Strukturen herbeiführt und das Absterben der Zellen bedingen kann [Berneburg et al., 2006; Unfried et al., 2007].

Im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen konnte K. Pulskamp [2008] in humanen Alveolarepithelzellen (A549) nach 24-stündiger Inkubation mit SWCNTs bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml keine Abnahme der mitochondrialen Aktivität und damit der Zellviabilität feststellen. Jedoch wurden die Partikel nicht wie in der vorliegenden Arbeit per Gradientenzentrifugation gereinigt und mit NaCl dispergiert, sondern säurebehandelt ohne chemische Zusätze suspendiert. Der Restmetallgehalt (Co, Ni) dieser SWCNTs betrug ca. 2,5 wt.%, was mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Metallgehalten vergleichbar ist (< 3,8 wt.%). Jedoch wurden keine Größenmessungen durchgeführt, so dass nicht gesagt werden kann, ob die in der Studie von K. Pulskamp [2008] erlangten Ergebnisse möglicherweise auf einen größeren Durchmesser oder eine Agglomeration der untersuchten SWCNTs zurückzuführen sind.

Derartige Diskrepanzen bezüglich des zytotoxischen Verhaltens von CNTs sind in der Literatur mehrfach zu finden. So existieren einerseits Studien, in welchen zytotoxische Effekte von CNTs festgestellt wurden [Cui et al., 2005; Jia et al., 2005; Shvedova et al., 2003; 2005; Soto et al., 2005; Wick et al., 2007], andererseits aber auch Studien, in denen keine Beeinflussung der Zellviabilität zu beobachten war [Bianco, 2004; Chlopek et al., 2006; Flahaut et al., 2006]. Auch bezüglich der Ursache der zytotoxischen Wirkung dieser Klasse der Nanomaterialien herrscht Uneinigkeit. Während einige Studien die Ansicht vertreten, dass die zytotoxischen Eigenschaften von CNTs auf die aus deren Herstellung herrührenden Metallverunreinigungen und die durch diese ausgelöste Erhöhung des zellulären ROS-Gehalts zurückzuführen sind [Pulskamp et al., 2007; Kagan et al., 2006; Wörle-Knirsch et al., 2006], existieren Studien, welche zellschädigende Eigenschaften in diversen Zelllinien (u.a. humane Nierenzellen, Alveolarmakrophagen, humane Keratinozyten) unabhängig vom Reinheitsgrad der CNTs feststellen konnten [Davoren et al., 2007; Ding et al., 2005; Jia et al., 2005; Manna et al., 2005; Monteiro-Riviere et al., 2005; Murr et al., 2005; Tamura et al., 2004]. Jedoch erstrecken sich die für die Untersuchungen eingesetzten SWCNT-Konzentrationen über einen Bereich von 0,06 - 800 µg/ml, wobei deutliche zytotoxische Eigenschaften sowohl bereits in sehr niedrigen (> 0,6 µg/ml) [Ding et al., 2005] als auch in hohen Konzentrationen (> 800 µg/ml) [Davoren et al., 2007] beobachtet wurden. Diese starken Abweichungen der Ergebnisse untereinander gründen auf mehreren Faktoren: Zum Einen spielt

die Vielfältigkeit des eingesetzten Untersuchungsmaterials eine entscheidende Rolle. So werden CNT-Präparationen unterschiedlicher Größenverteilungen und Reinheitsgrade eingesetzt, welche zudem in verschiedenen „surfactants“ dispergiert werden. Zum Anderen werden Zelllinien für die Untersuchungen herangezogen, welche sich in ihrer Sensitivität gegenüber diesem Nanomaterial erheblich unterscheiden können. Nicht zuletzt ist das Spektrum der angewendeten Methoden sehr breit. Des Weiteren wurde mehrfach von einer Interaktion von SWCNTs mit einer Vielzahl molekularer Verbindungen, wie Farbstoffen, Polysacchariden oder Biomolekülen berichtet [Casey et al., 2005; Wörle-Knirsch et al., 2006; Yang et al., 2009]. So ist bspw. in der bereits erwähnten Studie von Yang et al. [2009] neben dem WST-1- zusätzlich der MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Assay durchgeführt worden. Das Prinzip beruht analog zum WST-1-Assay auf der Bestimmung der mitochondrialen Aktivität. Es wird hierzu das gelbe Tetrazoliumsalz MTT durch mitochondrielle Dehydrogenasen in blau gefärbte Formazan-Kristalle überführt. Da die Formazan-Kristalle wasserunlöslich sind, werden sie vor der fotometrischen Vermessung in Isopropanol gelöst [Mosmann, 1983]. Das Ergebnis des von Yang et al. [2009] durchgeführten MTT-Assays stimmte jedoch nicht mit dem des WST-1-Assays überein. Die Aktivitätsabnahme folgte nicht dem Konzentrationsverlauf, sondern wurde in den höheren Konzentrationen geringer. Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse wurden auf eine Interaktion zwischen SWCNTs und den unlöslichen Formazan-Kristallen zurückgeführt. Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigten, dass der Formazan-Farbstoff Nanoröhren bedeckt und miteinander „verklebt“ [Wörle-Knirsch et al., 2006]. Diese Interaktion lässt sich weder mechanisch noch chemisch lösen. In Folge dessen wird durch die im MTT-Assay erfolgende Isopropanolextraktion nicht die tatsächlich vorhandene Menge an Formazan erfasst, was daraufhin zu falsch-negativen Aussagen führen kann [Pulskamp, 2008]. Casey et al. [2008] haben zudem gezeigt, dass SWCNTs durch eine Wechselwirkung mit den Bestandteilen des Zellkulturmediums, demnach also indirekt, zu einer Viabilitätsabnahme beitragen können. Im Rahmen der Untersuchungen von Casey et al. [2008] wurden konfluent wachsende A549-Zellen gegenüber SWCNTs exponiert. Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium filtriert und die Zellviabilität mittels Alamar Blue (AB)-Assay, einem gängigen Zellproliferations-Test, bestimmt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass SWCNTs Bestandteile des Nährmediums adsorbieren und resultierend daraus zu einer Wachstumshemmung führen. Eine auf eine derartige Wechselwirkung zurückzuführende Beeinflussung des Zellwachstums kann in der vorliegenden Arbeit aufgrund der negativen Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusses und LDH-Assays nach 24-stündiger Inkubation ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde eine mögliche Interaktion zwischen dem Nanomaterial und dem Farbstoff des WST-1-Assays in zellfreien Experimenten überprüft, mit dem Ergebnis, dass die Absorptionen des Farbstoffs und des SWCNT-Farbstoff-Gemisches nahezu vergleichbar waren.

Insgesamt betrachtet ist ein Vergleich bestehender Forschungsergebnisse zur Zytotoxizität von CNTs aufgrund der Verwendung verschiedener CNT-Modifikationen, Zellmodelle und Durchführungsprotokolle sowie einer unzureichenden Charakterisierung des Untersuchungsmaterials erheblich erschwert. Zudem zeigen die Studien von Yang et al. [2009] und Casey et al. [2008],

dass bestimmte Toxizitätstestsysteme wie bspw. der MTT-Test durch CNTs beeinflusst werden können und sich deshalb für deren Untersuchung nicht eignen. Dies führt unweigerlich zu der Forderung nach einer eingehenden Charakterisierung des Untersuchungsmaterials sowie nach der Entwicklung standardisierter und auf CNTs angepasster Untersuchungsmethoden, um fundierte Aussagen hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials treffen zu können.

4.1.4 Modulation des zellulären Redoxstatus durch SWCNTs

Zur Beurteilung einer den zellulären Redoxstatus modulierenden Wirkung von SWCNTs wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, durch welche eine Beeinflussung des ROS-Gehalts der Zelle nach Exposition gegenüber diesem Nanomaterial erfasst werden sollte. Weiterhin wurde der Fokus auf eine mögliche Modulation antioxidativer Verteidigungsmechanismen der Zelle gelegt. Hierzu wurden die Auswirkungen einer SWCNT-Exposition zum Einen auf den intrazellulären GSH-Gehalt und zum Anderen auf die Regulierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 untersucht.

4.1.4.1 Bildung reaktiver Spezies durch SWCNTs

Zur Erfassung der Modulation des zellulären ROS-Gehalts durch SWCNTs wurde der 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF)-Assay angewandt (siehe Abschnitt 5.11.1). Das Prinzip der Methode beruht auf der Umwandlung des nicht-fluoreszierenden Farbstoffs 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) zu fluoreszierendem DCF. DCFH-DA kann aufgrund seiner Lipophilie durch die Zellmembran hindurch diffundieren und wird in der Zelle von intrazellulären Esterasen deacetyliert, wodurch die Polarität zunimmt und 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) in der Zelle bleibt. Bei Anwesenheit von ROS wird DCFH zu DCF oxidiert, dessen Fluoreszenz fotometrisch gemessen werden kann [LeBel et al., 1992]. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der Inkubationen von HT29-Zellen mit SWCNTs über die Zeiträume 1, 2 und 3 h. Als Positivkontrolle diente der Redoxcyclus Menadion (MEN, 20 μ M; siehe Abschnitt 2.6.1). Die Fluoreszenzzunahmen der behandelten Proben wurden auf die Kontrolle (NaC 0,02 %) normiert und in der grafischen Darstellung als prozentuale Fluoreszenz (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

Abbildung 4.10 zeigt, dass SWCNTs in HT29-Zellen ab einer Konzentration von 0,05 μ g/ml ($\hat{=}$ 11,7 ng/cm²) zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität führen und sich diese mit zunehmender Inkubationszeit verringert. So ist die Fluoreszenzintensität nach 1-stündiger Inkubation bei einer Konzentration von 0,05 μ g/ml bereits mit (237 ± 67) % gegenüber der NaC-Kontrolle erhöht und steigt in der höchsten getesteten Konzentration von 0,2 μ g/ml ($\hat{=}$ 46,7 ng/cm²) mit (637 ± 79) % auf das Sechsfache der Kontrolle an. Nach 2-stündiger Inkubationsdauer beträgt die Fluoreszenzintensität in der höchsten getesteten Konzentration (530 ± 94) % gegenüber der NaC-Kontrolle und verringert sich nach 3 h mit (333 ± 89) % auf etwa die Hälfte der nach einer Inkubationszeit von 1 h gemessenen Fluoreszenzintensität.

Auch der Redoxcyclus MEN (20 μ M) führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität, welche ebenfalls mit einer Verlängerung der Expositionsdauer abnimmt. Nach 1 h Inkubation erreicht

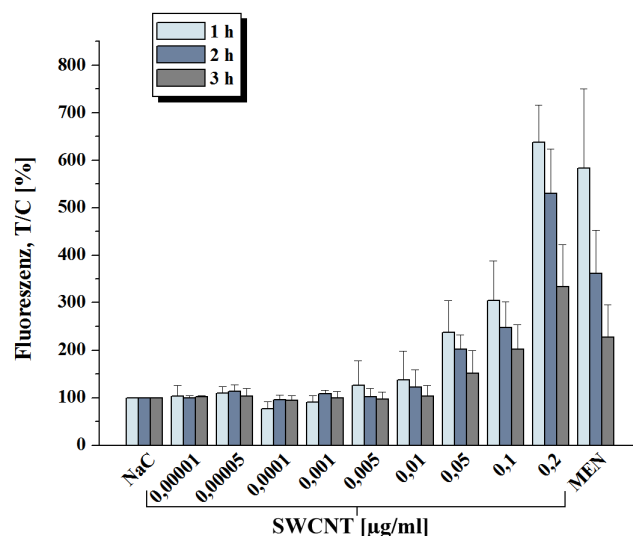


Abbildung 4.10: Modulation des zellulären ROS-Gehalts in HT29-Zellen nach 1, 2 und 3-stündiger Inkubation mit SWCNTs, bestimmt mittels DCF-Assay. Menadion (MEN, 20 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von mind. vier unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung in Relation zur NaC-Kontrolle (0,02 %). $0,1 \text{ µg/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

MEN mit einer Intensität von $(583 \pm 167) \%$ gegenüber der Kontrolle einen mit der höchsten SWCNT-Konzentration vergleichbaren Wert, der sich nach 3 h auf $(227 \pm 68) \%$ verringert.

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die beobachteten Effekte prinzipiell auch nach Inkubation von SWCNTs mit DCFH-DA unter zellfreien Bedingungen festgestellt werden können und sich unter Zusatz des Enzyms Katalase verringern. Das Enzym Katalase ist an der Umsetzung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 beteiligt (siehe Abschnitt 2.6.2.1). Eine Abnahme der Fluoreszenz unter Zusatz von Katalase würde somit auf die Generierung von H_2O_2 unter zellfreien Bedingungen hindeuten. Hierzu wurden die SWCNTs in den im DCF-Assay getesteten Konzentrationen mit der im Zellsystem eingesetzten DCFH-DA Konzentration (50 µM) zellfrei ohne bzw. mit Zusatz von Katalase (100 U/ml) inkubiert. Das Ergebnis einer 1-stündigen Inkubation von SWCNTs mit DCFH-DA ist in Abb. 4.11 dargestellt.

Die Fluoreszenzzunahmen der einzelnen Proben wurden auf die Kontrolle (NaC 0,02 %) normiert und in der grafischen Darstellung als prozentuale Fluoreszenz (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

Abbildung 4.11 zeigt, dass DCFH-DA auch nach Inkubation mit SWCNTs unter zellfreien Bedingungen zum fluoreszierenden DCF umgesetzt wird. Dieser Effekt setzt bereits bei einer SWCNT-Konzentration von $0,005 \text{ µg/ml} (\hat{=} 1,2 \text{ ng/cm}^2)$ ein ($(164 \pm 9) \%$ im Vergleich zur Kontrolle) und erreicht bei einer Konzentration von $0,1 \text{ µg/ml} (\hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2)$ mit einer Fluoreszenzintensität von $(1312 \pm 83) \%$ gegenüber der NaC-Kontrolle (0,02 %) sein Maximum. In der höchsten getesteten Konzentration von $0,2 \text{ µg/ml}$ ist indes eine Verringerung der Fluoreszenzintensität auf $(926 \pm 58) \%$ gegenüber der NaC-Kontrolle zu beobachten. Zudem ist festzustellen, dass sich die beobachteten Effekte durch den Zusatz des Enzyms Katalase verringern. So reduziert sich

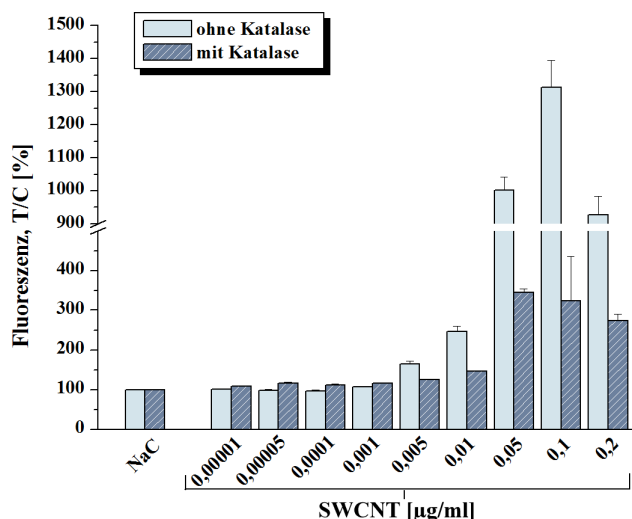


Abbildung 4.11: Interaktion von SWCNTs mit DCFH-DA nach 1-stündiger Inkubation im zellfreien System ohne und mit Zusatz von Katalase (100 U/ml). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung in Relation zur NaC-Kontrolle (0,02 %). 0,1 µg/ml $\hat{=}$ 23,4 ng/cm².

die Fluoreszenzintensität bei einer SWCNT-Konzentration von 0,1 µg/ml durch den Zusatz des Enzyms auf etwa ein viertel ((324 ± 111) %).

Ausgehend von den vorausgegangenen Beobachtungen wurde der DCF-Assay mit Zusatz von Katalase auch im Zellsystem durchgeführt. Um einen direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen mit und ohne Zugabe des Enzyms zu erhalten, wurde zusätzlich nochmals ohne Katalase inkubiert. Die Ergebnisse einer 1-, 2- und 3-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs ohne und mit Zusatz von 100 U/ml Katalase sind in Abb. 4.12 dargestellt. Analog zu der grafischen Darstellung aus Abb. 4.10 wurden die Fluoreszenzerhöhungen der behandelten Proben auf die Kontrolle (NaC 0,02 %) normiert und die prozentuale Fluoreszenz (T/C) der mit und ohne Katalase inkubierten Proben im Vergleich zueinander gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

Wie Abb. 4.12 zu entnehmen ist, bewirkt der Zusatz von Katalase (100 U/ml) eine Abnahme der Fluoreszenzintensität ab einer SWCNT-Konzentration von 0,05 µg/ml nach 1- und 2-stündiger Inkubationsdauer. Nach einer Inkubation von 3 h setzt dieser Effekt erst ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ein. Dabei wird die Fluoreszenzintensität nach Zusatz von Katalase in der höchsten getesteten Konzentration von 0,2 µg/ml nach einer Inkubationsdauer von 1 und 2 h um nahezu die Hälfte reduziert (1 h Inkubation: ohne Katalase (628 ± 95) %, mit Katalase (314 ± 33) %; 2 h Inkubation: ohne Katalase (536 ± 114) %, mit Katalase (278 ± 32) %). Auffällig ist, dass die Fluoreszenzintensitäten nach Zusatz von Katalase nach allen Inkubationszeiten in der jeweiligen Konzentration vergleichbar sind. So beträgt die Fluoreszenz bei einer Konzentration von 0,2 µg/ml nach 1-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs unter Zusatz von Katalase (314 ± 33) %, nach 2-stündiger Inkubation (278 ± 32) % und nach 3-stündiger Inkubation (256 ± 13) % gegenüber der NaC-Kontrolle. Die Fluoreszenzintensitäten der Katalase-unbehandelten

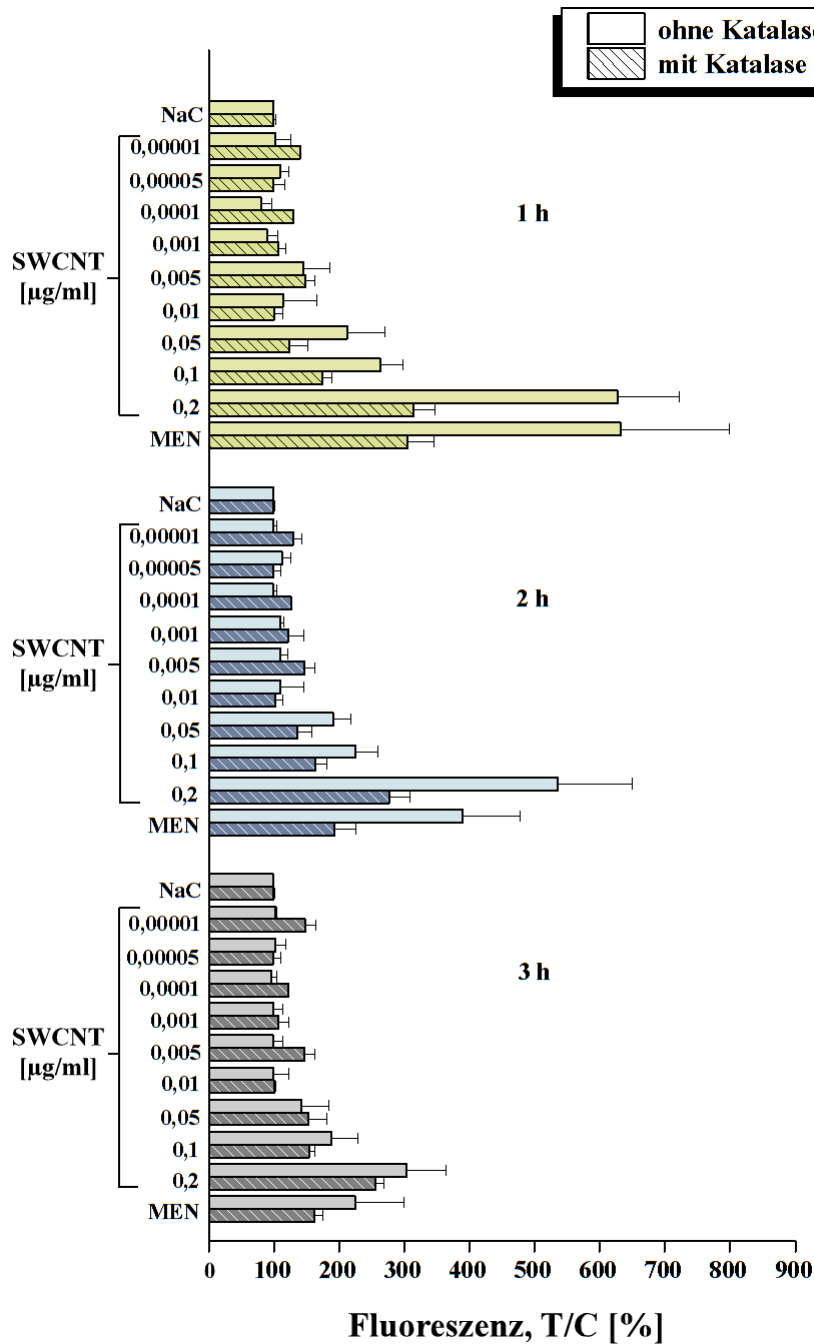


Abbildung 4.12: Modulation des zellulären ROS-Gehalts in HT29-Zellen nach 1, 2 und 3-stündiger Inkubation mit SWCNTs ohne und mit Zusatz von Katalase (100 U/ml), bestimmt mittels DCF-Assay. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung in Relation zur NaC-Kontrolle (0,02 %). $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

Proben nehmen hingegen bei genannter Konzentration mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich ab. Demnach ist keine anteilige Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Katalase zu beobachten.

Auch bei der Positivkontrolle MEN (20 μM) ist nach Zugabe des H_2O_2 -abbauenden Enzyms ein Rückgang der Fluoreszenz festzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h verringert sich der ermittelte Wert von $(632 \pm 167) \%$ auf $(305 \pm 41) \%$ gegenüber der Kontrolle. Bei den Inkubationszeiträumen von 2 und 3 h sind die Fluoreszenzintensitäten nach Zugabe von Katalase mit $(194 \pm 32) \%$ (2 h) und $(163 \pm 12) \%$ (3 h) wiederum vergleichbar.

Insgesamt betrachtet, führen SWCNTs sowohl im Zellsystem als auch unter zellfreien Bedingungen zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität im DCF-Assay. Durch den Zusatz des H_2O_2 -abbauenden Enzyms Katalase ist in beiden Systemen eine Verringerung der Fluoreszenzzunahme feststellbar. Zudem korreliert im Zellsystem die konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität invers mit der Inkubationsdauer.

4.1.4.2 Entstehung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium durch SWCNTs

Vor dem Hintergrund der im DCF-Assay ohne und mit Zusatz von Katalase erhaltenen Ergebnisse, wurde nachfolgend untersucht, ob SWCNTs zur Entstehung von H_2O_2 beitragen.

Zur Erfassung der H_2O_2 -Konzentration im Zellkulturmedium unter Inkubationsbedingungen wurde der Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide Assay (Invitrogen) herangezogen. In Gegenwart von Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP) reagiert das Amplex[®] Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydroxy-Phenoxazin, siehe Abschnitt 4.13) mit H_2O_2 zum rot fluoreszierenden Oxidationsprodukt Resorufin, welches fotometrisch erfasst werden kann. Der Assay wurde sowohl unter zellfreien Bedingungen als auch im Zellsystem durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde dem Zellkulturmedium H_2O_2 zugesetzt. Abbildung 4.13 zeigt das Ergebnis der 1-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs.

Die H_2O_2 -Konzentration der einzelnen Proben wurde anhand einer Kalibriergeraden errechnet und ist als H_2O_2 [μM] gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

Wie aus Abb. 4.13 hervorgeht, ist keine Entstehung von H_2O_2 durch SWCNTs im Zellkulturmedium zu beobachten. Der H_2O_2 -Gehalt der SWCNT-behandelten Proben bewegt sich über den gesamten Konzentrationsbereich von 0,001 - 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf dem Niveau der NaC-Kontrolle. Auch unter zellfreien Bedingungen ist keine SWCNT-vermittelte H_2O_2 -Generierung festzustellen (Daten nicht gezeigt).

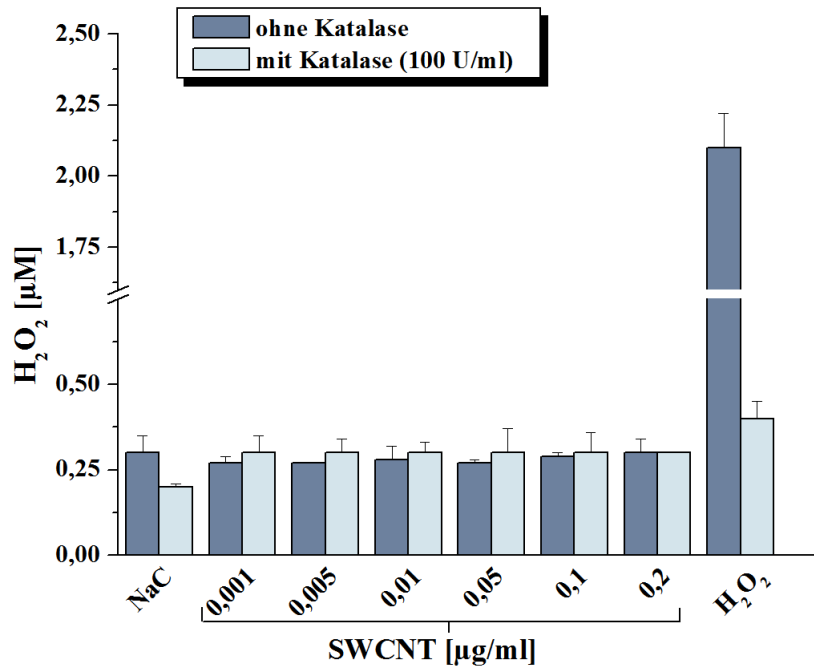


Abbildung 4.13: Entstehung von H_2O_2 durch SWCNTs im Zellkulturmedium nach 1-stündiger Inkubation mit HT29-Zellen mit und ohne Zusatz von Katalase (100 U/ml), bestimmt mittels Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide Assay (Invitrogen). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von zwei unabhängigen Versuchen in einer Doppelbestimmung. NaC: Lösungsmittelkontrolle von 0,02 % im Endansatz. $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

4.1.4.3 Einfluss von SWCNTs auf den nukleären Nrf2-Gehalt

Um die Ergebnisse des DCF-Assays im Hinblick auf die Generierung von oxidativem Stress durch weitere Parameter zu stützen, wurde der Einfluss von SWCNTs auf den nukleären Nrf2-Gehalt bestimmt. Das Nrf2-Protein ist ein zentraler Faktor bei der Aktivierung der Gentranskription von Phase-II-Entgiftungsenzymen, die u.a. an der Detoxifizierung von RS beteiligt sind und somit einen Bestandteil des zellulären Abwehrsystems gegenüber zellulärem Stress darstellen (siehe Abschnitt 2.6.3). Dabei wird infolge von Stressbedingungen wie bspw. einem das physiologische Maß übersteigenden Gehalt an RS eine Translokation von Nrf2 in den Zellkern bewirkt, wo das Protein nach Heterodimerisierung als Transkriptionsfaktor wirken kann [Nguyen et al., 2004; Toyokuni und Akatsuka, 2007].

Eine Beeinflussung des nukleären Nrf2-Gehalts durch SWCNTs in HT29-Zellen wurde nach 1- und 3-stündiger Expositionsdauer untersucht. Um ausschließlich den nukleären Nrf2-Gehalt zu erfassen, wurden die Zellkompartimente Zytosol und Kern durch Lysepuffer aufsteigender Stärke voneinander getrennt. Die Bestimmung des Nrf2-Gehalts im Zellkern erfolgte mittels Western Blot Analyse mit anschließender immunochemischer Detektion. Um die Trennung der beiden Zellkompartimente beurteilen zu können, wurde in der zytosolischen und in der Kernfraktion das nukleäre Protein Lamin B miterfasst. α -Tubulin wurde als Beladungskontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente n-Chlorogensäure („chlorogenic acid“, CGA; siehe Abb. 4.14) in einer Konzentration von 100 μM . CGA ist ein Naturstoff, der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine

antioxidative Wirkung zeigt und zum Anschalten des Nrf2/ARE Signalwegs führt [Feng et al., 2005; Kasai et al., 2000].

Die nukleären Nrf2-Gehalte der Proben und der jeweiligen Kontrolle (Kontrolle für SWCNTs = NaC 0,02 %, Kontrolle für CGA = DMSO 1 %) wurden zueinander in Bezug gesetzt und der prozentuale Nrf2-Gehalt im Zellkern als (T/C) in [%] gegen die getesteten Konzentrationen grafisch aufgetragen. Abbildung 4.15 zeigt das Ergebnis der 1-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs.

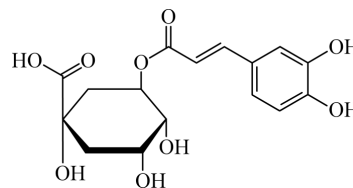


Abbildung 4.14: Struktur von n-Chlorogensäure (CGA).

Im unteren Konzentrationsbereich von 0,0001 - 0,001 $\mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ 0,02 - 0,2 ng/cm^2) ist zunächst eine Erhöhung des nukleären Nrf2-Gehalts auf einen Wert von 157 % zu beobachten, der sich jedoch aufgrund der hohen Schwankungsbreiten ($\pm$ 54 %) nicht deutlich von der NaC-Kontrolle unterscheidet (siehe Abb. 4.15). Mit zunehmender SWCNT-Konzentration sinkt der Nrf2-Gehalt auf (113 ± 7) % gegenüber der Kontrolle, nimmt aber im weiteren Konzentrationsverlauf (bis 0,2 $\mu\text{g/ml}$) erneut zu. In der höchsten getesteten Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ 46,7 ng/cm^2) beträgt der Nrf2-Gehalt in der Kernfraktion (143 ± 22) % im Vergleich zur NaC-Kontrolle. Auch die Positivkontrolle CGA bewirkt nach 1-stündiger Inkubation eine Erhöhung des nukleären Gehalts an Nrf2-Protein auf (123 ± 7) % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO.

Nach 3-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs (siehe Abb. 4.16) konnte in der untersuchten Zelllinie hingegen keine Erhöhung des Nrf2-Gehalts in der Kernfraktion festgestellt werden. Vielmehr ist ab einer Konzentration von 0,005 $\mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ 1,2 ng/cm^2) eine marginale Abnahme des nukleären Nrf2-Proteingehalts um maximal 15 % bezogen auf die NaC-Kontrolle zu erkennen. Dem gegenüber wird der nukleäre Nrf2-Gehalt durch die Positivkontrolle CGA auf (132 ± 10) % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöht.

Da in der Kernfraktion das nukleäre Protein Lamin B deutlich und in der zytosolischen Fraktion nur marginal detektiert wurde, kann von einer guten Trennung der beiden Zellkompartimente und damit der ausschließlichen Erfassung des nukleären Nrf2-Proteins ausgegangen werden.

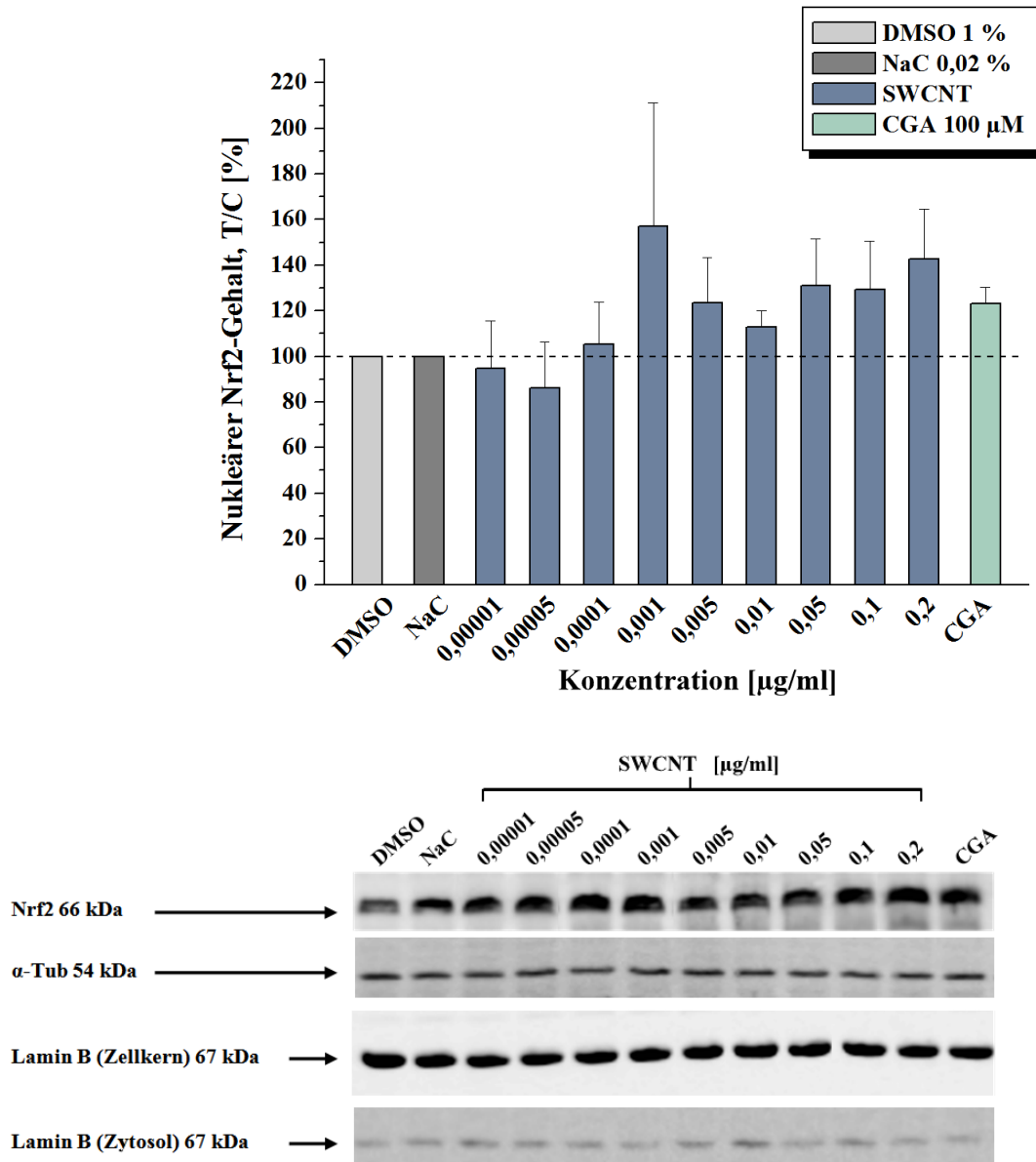


Abbildung 4.15: Nukleärer Nrf2-Gehalt in HT29-Zellen nach 1-stündiger Inkubation mit SWCNTs, bestimmt mittels Western Blot Analyse. Chlorogensäure (CGA, 100 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD (oben) und repräsentative Blotbilder (unten) von drei unabhängigen Versuchen in Relation zur jeweiligen Kontrolle (Kontrolle für SWCNTs = NaC 0,02 %, Nukleärer Nrf2-Gehalt = 100 %; Kontrolle für CGA = DMSO 1 %, Nukleärer Nrf2-Gehalt = 100 %). 0,1 µg/ml $\hat{=}$ 23,4 ng/cm².

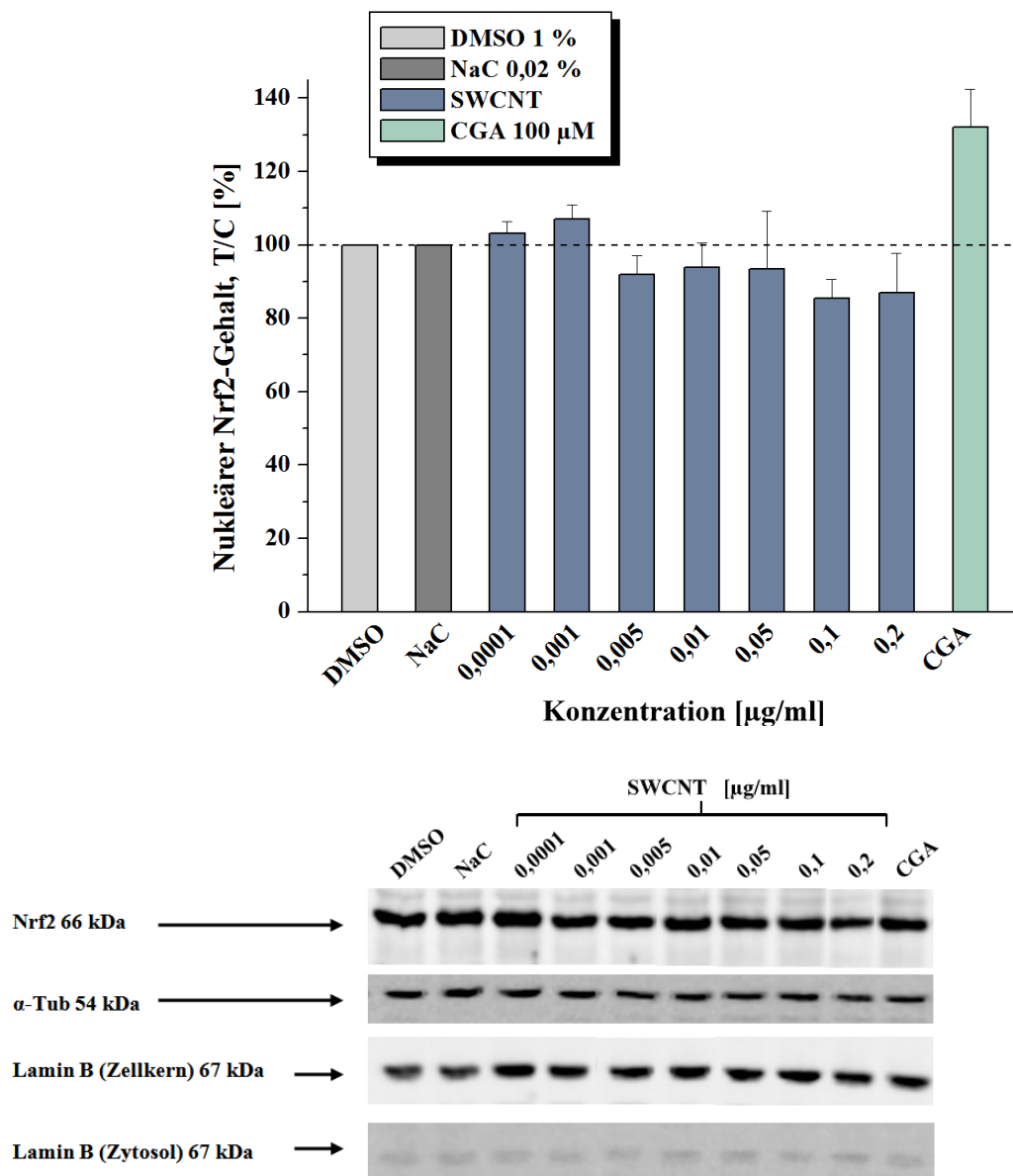


Abbildung 4.16: Nukleärer Nrf2-Gehalt in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit SWCNTs, bestimmt mittels Western Blot Analyse. Chlorogensäure (CGA, 100 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD (oben) und repräsentative Blotbilder (unten) von drei unabhängigen Versuchen in Relation zur jeweiligen Kontrolle (Kontrolle für SWCNTs = NaC 0,02 %, Nukleärer Nrf2-Gehalt = 100 %; Kontrolle für CGA = DMSO 1 %, Nukleärer Nrf2-Gehalt = 100 %). 0,1 µg/ml $\hat{=}$ 23,4 ng/cm².

4.1.4.4 Einfluss von SWCNTs auf den zellulären Gesamtglutathiongehalt

Ausgehend von den Ergebnissen des DCF-Assays sowie der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 wurde der Einfluss von SWCNTs auf den zellulären Gesamtglutathiongehalt untersucht.

Glutathion (GSH) ist als zelluläres Antioxidans direkt in die Detoxifizierung potentiell schädlicher Spezies aber auch in weitere physiologische Prozesse involviert [Forman et al., 2009] und gilt daher als der wichtigste Redox-Puffer der Säugetierzelle [Filomeni, 2002]. Durch die freie Thiolgruppe an der Cystein-Komponente des Tripeptids besitzt GSH ein stark nukleophiles Reaktionszentrum, durch das elektrophile Spezies wie RS abgefangen werden. GSH wechselt dabei zwischen reduzierter Thiolform (GSH) und oxidierte Form (GSSG), in der zwei Tripeptide über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind (siehe Abschnitt 2.6.2.2)

Zur Untersuchung einer den zellulären GSH-Gehalt beeinflussenden Wirkung von SWCNTs wurde der GSH-Assay nach Tietze [1969] durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung

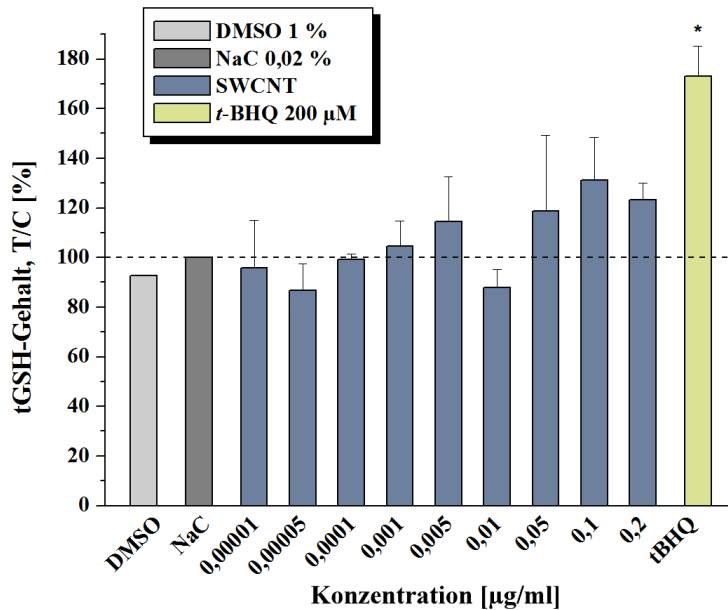


Abbildung 4.17: tGSH-Gehalt in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit SWCNTs, bestimmt mittels GSH-Assay nach Tietze [1969]. Der tGSH-Gehalt ist auf 1 mg Protein normiert (100 % = $25,44 \pm 5,75$ nmol/mg Protein). Tertiär-Butylhydrochinon (*t*-BHQ, 300 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten. Der Signifikanzunterschied der Positivkontrolle *t*-BHQ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO 1 %) wurde mittels Student's *t*-Test anhand der Absolutwerte (nmol tGSH/mg Protein) berechnet (* = $p < 0,05$). $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

des Gesamtglutathiongehalts (Summe aus GSH und GSSG; „total“ GSH, tGSH) einer Zelle, indem das in der Zelle vorhandene GSSG in GSH überführt wird. Durch einen parallelen Versuchsansatz, in dem GSH durch Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin eliminiert wird, kann der GSSG-Gehalt ermittelt und somit auch der GSH-Anteil berechnet werden (siehe Abschnitt 5.11.2). Somit gewährt diese Methode zum Einen durch Ermittlung des GSH/GSSG-Verhältnisses Rück-

schlüsse auf den Redoxstatus der Zelle und gibt zum Anderen durch Bestimmung des tGSH-Gehalts Hinweise auf weitere Wirkmechanismen des zu untersuchenden Materials.

In der vorliegenden Arbeit kann jedoch keine Aussage hinsichtlich einer Beeinflussung des GSSG-Gehalts durch SWCNTs gemacht werden, da eine valide quantitative Bestimmung dieser Komponente nicht möglich war. Ein möglicher Grund hierfür sind die geringen GSSG-Gehalte in der für die Untersuchungen eingesetzten HT29-Zelllinie, welche lediglich Messungen im Bereich der Nachweisgrenze erlauben und somit die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken. Im Folgenden wird daher ausschließlich auf die Ergebnisse zur Modulation des tGSH-Gehalts durch SWCNTs eingegangen.

Der Einfluss von SWCNTs auf den zellulären tGSH-Gehalt in HT29-Zellen wurde nach 3- und 24-stündiger Exposition untersucht. Die Positivkontrollen wurden entsprechend der Inkubationsdauer gewählt. Abbildung 4.17 zeigt das Ergebnis der 3-stündigen Inkubation mit SWCNTs. Als Positivkontrolle wurde tertiär-Butylhydrochinon (*t*-BHQ) eingesetzt (siehe Abb. 4.18). *t*-BHQ trägt durch dessen Autoxidation zum Semichinon und anschließender Oxidation zum Chinon zur Bildung von ROS und demzufolge zu einer Modulation des zellulären GSH-Gehalts bei [Yu et al., 1997].

Die auf 1 mg Protein normierten tGSH-Gehalte der behandelten Proben wurden auf die zugehörige Kontrolle bezogen (Bezug für SWCNTs = NaC 0,02 %, Bezug für *t*BHQ = DMSO 1 %) und sind als prozentualer tGSH-Gehalt (T/C) grafisch dargestellt. Wie Abb. 4.17 zu entnehmen, führen SWCNTs in HT29-Zellen nach einer Expositionsdauer von 3 h zu

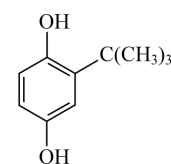


Abbildung 4.18: Struktur von tertiär-Butylhydrochinon (*t*-BHQ).

einem leichten Anstieg des zellulären tGSH-Gehalts, der jedoch nicht konzentrationsabhängig verläuft. So nimmt der Gehalt an tGSH im Konzentrationsbereich von 0,00005 - 0,005 µg/ml ($\hat{=}$ 0,01 - 1,2 ng/cm²) leicht zu, verringert sich aber bei 0,01 µg/ml ($\hat{=}$ 2,3 ng/cm²) SWCNTs auf (88 ± 7) % gegenüber der Kontrolle. Mit ansteigender Konzentration ist eine erneute Zunahme des zellulären tGSH-Gehalts zu beobachten, die bei einer Konzentration von 0,2 µg/ml ($\hat{=}$ 46,7 ng/cm²) mit (123 ± 7) % im gemessenen Konzentrationsbereich ihr Maximum erlangt. Statistische Signifikanz wird jedoch nicht erreicht. Die Positivkontrolle *t*-BHQ führt zu einem signifikanten Anstieg des tGSH-Gehalts auf (173 ± 7) % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %).

Die Ergebnisse der 24-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs sind in Abb. 4.19 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO) (siehe Abb. 4.20) in der Konzentration von 1 mM eingesetzt. BSO ist eine synthetische Aminosäure, welche das zur Neusynthese von GSH notwendige Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase irreversibel hemmt. In der Folge führt dies zur Senkung des tGSH-Spiegels [Marengo et al., 2008].

Eine 24-stündige Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs bewirkt in einem Konzentrations-

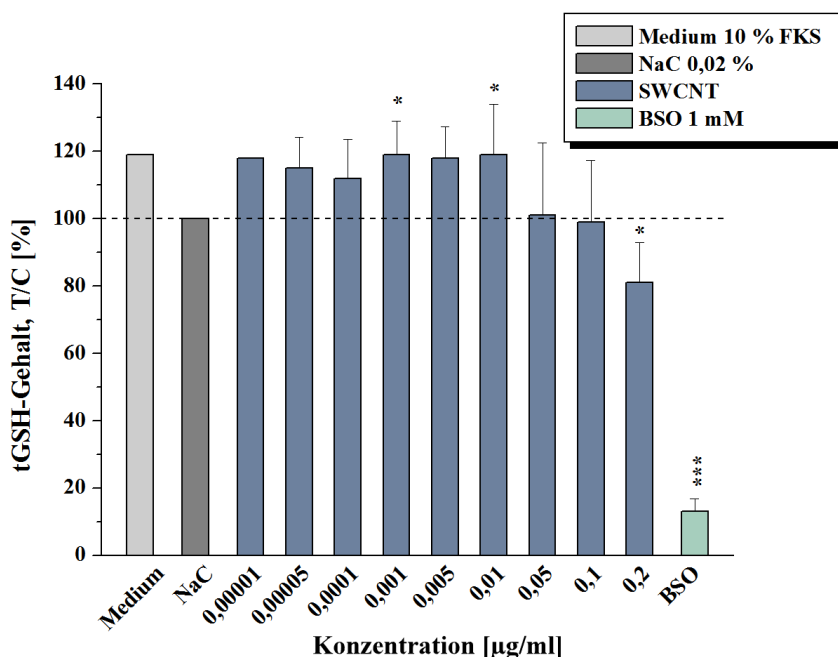


Abbildung 4.19: tGSH-Gehalt in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit SWCNTs, bestimmt mittels GSH-Assay nach Tietze [1969] (in Zusammenarbeit mit A. Rechel, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2009). Der tGSH-Gehalt ist auf 1 mg Protein normiert (100 % = $25,11 \pm 2,66$ nmol/mg Protein). Buthioninsulfoximin (BSO, 1 mM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für SWCNTs = NaC, Signifikanzbezug für BSO = Medium 10 % FKS) wurden mittels Student's *t*-Test anhand der Absolutwerte (nmol tGSH/mg Protein) berechnet (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$). $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

bereich von $0,00001 - 0,01 \mu\text{g/ml}$ zunächst eine leichte Zunahme des tGSH-Gehalts von bis zu $(119 \pm 10) \%$ ($0,001 \mu\text{g/ml} \hat{=} 0,2 \text{ ng/cm}^2$) gegenüber der NaC-Kontrolle. Dabei wird bei den

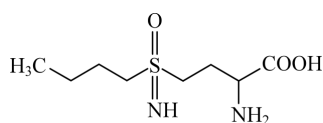


Abbildung 4.20: Struktur von L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO).

SWCNT-Konzentrationen von $0,001$ und $0,01 \mu\text{g/ml}$ statistische Signifikanz erreicht. Ab einer SWCNT-Konzentration von $0,05 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=} 11,7 \text{ ng/cm}^2$) ist indes eine konzentrationsabhängige Abnahme des tGSH-Gehalts zu beobachten, die bei der höchsten getesteten Konzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$ mit $(81 \pm 12) \%$

gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant ist. Die Positivkontrolle BSO führt zu einer signifikanten Abnahme des tGSH-Gehalts um etwa 87 % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (Medium 10 % FKS).

4.1.4.5 Zusammenfassung und Diskussion zur Modulation des zellulären Redoxstatus durch SWCNTs unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Zytotoxizität

SWCNTs bewirkten nach Inkubation mit HT29-Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität im DCF-Assay, was auf eine Beeinflussung des zellulären ROS-Gehalts durch dieses Nanomaterial hindeutet. Dieser Effekt setzte bereits nach 1-stündiger Expositionsdauer ein und war in der höchsten getesteten Konzentration gegenüber der Kontrolle um mehr als das sechsfache erhöht (siehe Abb. 4.10). Mit zunehmender Expositionsdauer war eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, so dass nach 3-stündiger Inkubation in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration ein gegenüber der 1-stündigen Inkubation um bis zu 50 % vermindertes Fluoreszenzsignal detektiert wurde (siehe Abb. 4.10). Ergänzend zu den Ergebnissen des DCF-Assays war nach einer Expositionszeit von 1 h eine geringe Erhöhung des Nrf2-Gehalts im Zellkern zu erkennen (siehe Abb. 4.15). Dabei traten Fluoreszenzzunahme und Beeinflussung des nukleären Nrf2-Gehalts im gleichen SWCNT-Konzentrationsbereich auf. Mit zunehmender Expositionszeit (3 h) war indes ein leichter Rückgang des Nrf2-Gehalts im Zellkern zu erkennen. (siehe Abb. 4.16). Des Weiteren erhöhte sich nach 3-stündiger Inkubation mit SWCNTs der zelluläre tGSH-Gehalt von HT29-Zellen (siehe Abb. 4.17). Dies korreliert mit den Ergebnissen des DCF-Assays und der Beeinflussung des nukleären Nrf2-Gehalts nach 1-stündiger Inkubation insofern, als dass ein erhöhter Nrf2-Gehalt im Zellkern mit der Genexpression Phase-II-detoxifizierender Enzyme verbunden ist [Toyokuni und Akatsuka, 2007]. Unter diesen Phase-II-Entgiftungsenzymen ist u.a. die γ -GCL vertreten, das Schrittmacherenzym der GSH-Synthese. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 wird wiederum neben anderen Aktivatoren durch einen das physiologische Maß übersteigenden ROS-Gehalt induziert. Nach Verlängerung der Inkubationsdauer war indes eine geringe Abnahme des zellulären tGSH-Gehalts auf 81 % gegenüber der Kontrolle festzustellen (siehe Abb. 4.19). Dies könnte auf den nach einer 24-stündigen Exposition beobachteten Funktionsverlust der Mitochondrien und eine daraus resultierende Erhöhung des zellulären ROS-Gehalts zurückzuführen sein [Foley et al., 2002; Oberdörster et al., 2005a; Zhu et al., 2006].

Die beschriebenen Ergebnisse deuten insgesamt zunächst darauf hin, dass in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs in HT29-Zellen innerhalb von 1 h zu einer Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts führten, worauf über die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs die Expression detoxifizierender Enzyme ausgelöst wurde. Dies hatte eine Erhöhung des zellulären tGSH-Gehalts zur Folge, wodurch ROS effizient durch GSH vermutlich abgefangen wurden. Aufgrund des Rückgangs des zellulären ROS-Gehalts war demnach mit zunehmender Inkubationszeit eine Abnahme des Fluoreszenzsignals im DCF-Assay sowie der nukleären Nrf2-Gehalts festzustellen.

Es gibt Studien, in welchen eine durch kohlenstoffhaltige NP aus der Umgebungsluft (wie z. B. CB sowie das C₆₀-Fulleren) vermittelte Erhöhung des zellulären ROS-Gehalts gezeigt wurde [Brown et al., 2004; Gilmour et al., 1996; Sayes et al., 2005; Sun et al., 2004]. Dabei wurde eine Korrelation zwischen ROS-Bildung und Zunahme der NP-Oberfläche festgestellt [Stone et al., 1998; Wilson et al., 2002]. Im Vergleich zu sphärischen Nanomaterialien weisen CNTs aufgrund

ihrer Dimensionen eine höhere Oberfläche auf, womit ihre Reaktivität erheblich verstärkt sein kann [Donaldson et al., 2006].

Yang et al. [2009] untersuchten ebenfalls die intrazelluläre Induktion von ROS durch SWCNTs (Ø: 8 nm, Länge: < 5 µm) mittels DCF-Assay nach 24-stündiger Inkubation. Bei dem untersuchten Zellsystem handelte es sich um PMEF-Zellen. Es konnte ein Anstieg von ROS über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (10 - 100 µg/ml) gemessen werden, wobei die Menge an ROS bei 100 µg/ml das Vierfache der Kontrolle betrug. Parallel wurden Bestimmungen des GSH-Gehalts und der SOD-Aktivität durchgeführt, wobei beide Endpunkte durch SWCNTs moduliert wurden. ROS-Bildung und Beeinflussung des intrazellulären GSH-Gehalts durch SWCNTs konnten auch durch Manna et al. [2005] und Shvedova et al. [2003] festgestellt werden. Ein Vergleich der Ergebnisse gestaltet sich schwierig, da sich die eingesetzten SWCNT-Konzentrationen über einen Bereich von 0,1 - 240 µg/ml erstreckten und verschiedene Zelllinien (u.a. Keratinozyten, Alveolarmakrophagen, embryonale Nierenzellen) für die Untersuchungen eingesetzt sowie hinsichtlich der Dimensionen des Testmaterials keine Angaben gemacht wurden. Auch bezüglich des Reinheitsgrads der SWCNTs sind im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs deutliche Unterschiede festzustellen.

SWCNTs können, bedingt durch ihren Herstellungsprozess, beträchtliche Mengen an Metallrückständen enthalten (bis zu 40 wt.%). Diese sind hauptsächlich in Form von NP vorzufinden und können die toxikologischen Eigenschaften des Nanomaterials erheblich beeinflussen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Mittels ICP-MS wurde ein Restmetallgehalt von 3,1 wt.% Co und 3,8 wt.% Ni ermittelt. Ein Zusammenhang zwischen dem Metallgehalt von SWCNTs und dem Grad des ROS-Anstiegs wurde von Pulskamp et al. [2007] an verschiedenen Zelllinien (humane Alveolarepithelzellen A549, Endothel-ähnliche Zelllinie ECV304 und Alveolarmakrophagen der Ratte NR8383) festgestellt. Es wurden verschiedene SWCNT-Materialien im Konzentrationsbereich von 5 - 100 µg/ml mittels DCF-Assay untersucht. Dabei war auffällig, dass lediglich unaufgereinigte SWCNTs (Co, Ni, Mo: 2,8 - 4,3 wt.%) zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des ROS-Gehalts bis auf das Fünffache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führten. Durch Säurebehandlung aufgereinigte SWCNTs (Co: 1,3; Ni: 1,2 wt.%) zeigten sich hingegen wirkungslos bezüglich der Induktion von ROS [Pulskamp et al., 2007]. Da der Restgehalt an Ni und Co der in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs im Bereich der für die unaufgereinigten ROS-generierenden SWCNTs durch Pulskamp et al. [2007] ermittelten Werte liegt, ist eine Metall-induzierte ROS-Bildung durch die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs denkbar. Dem gegenüber stehen Ergebnisse aus Studien wie der oben erwähnten von Yang et al. [2009], in der trotz eines Reinheitsgrads von > 99,9 % eine deutliche Erhöhung des zellulären ROS-Gehalts durch SWCNTs festgestellt wurde. Auch Brown et al. [2004], Gilmour et al. [1996], Sayes et al. [2005] und Sun et al. [2004] konnten in ihren Studien eine unabhängig vom Verunreinigungsgrad des Testmaterials erhöhte Bildung von ROS durch kohlenstoffhaltige Nanomaterialien zeigen.

In Anbetracht der vorhandenen Literatur scheint eine durch SWCNTs induzierte Beeinflussung des zellulären ROS-Gehalts wahrscheinlich, wenn auch der Beitrag metallischer Verunreinigun-

gen hierzu nicht eindeutig zu quantifizieren ist. Insgesamt betrachtet, war in dem in dieser Arbeit durchgeführten DCF-Assay allerdings ein weitaus deutlicherer Effekt zu beobachten, als es für die Modulation des nukleären Nrf2-Gehalts und des tGSH-Gehalts zu sehen war. Während nach 1-stündiger Inkubation die Fluoreszenzintensität gegenüber der Kontrolle um mehr als das Sechsfache erhöht war, was auf eine starke Induktion von oxidativem Stress hindeutet, waren die Ergebnisse zur Modulation des nukleären Nrf2- sowie des tGSH-Gehalts nur schwach ausgeprägt. Des Weiteren war nach 3-stündiger Expositionsdauer eine leichte Abnahme des Nrf2-Gehalts im Zellkern festzustellen, während in der höchsten getesteten Konzentration ($0,2 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ $46,7 \text{ ng/cm}^2$) im DCF-Assay eine Fluoreszenzerhöhung von etwa 300 % gegenüber der Kontrolle zu beobachten war. Wenn auch zwischen den untersuchten Endpunkten kein linearer Zusammenhang bezüglich der Ausprägung der beobachteten Effekte bestehen muss, ist der deutliche Unterschied zwischen den Ergebnissen der einzelnen Untersuchungen auffällig. Aufgrund dessen und im Hinblick auf die bereits vielfach beschriebene Beeinflussung toxikologischer Untersuchungsergebnisse von SWCNTs durch deren Interaktion mit dem Untersuchungsmaterial wurde der Farbstoff 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten SWCNTs über einen Zeitraum von 1 h unter den Bedingungen des DCF-Assays zellfrei inkubiert. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, der im Vergleich zu den im Zellsystem durchgeführten Untersuchungen bereits bei niedrigeren SWCNT-Konzentrationen begann. Dies kann sowohl für eine Interaktion zwischen dem Farbstoff und den SWCNTs als auch für eine bereits im zellfreien System unter Mitwirkung von Luftsauerstoff stattfindende Generierung von ROS sprechen. Die Beobachtung, dass sich die im zellfreien System detektierte Fluoreszenzintensität nach Zugabe des H_2O_2 -abbauenden Enzyms Katalase verminderte, weist auf die Bildung von H_2O_2 durch SWCNTs hin (siehe Abb. 4.11), womit die letztere Hypothese untermauert wird. Da das Fluoreszenzsignal nach Zugabe von Katalase nicht auf das Niveau der Kontrolle sank, ist neben der Entstehung von H_2O_2 die Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies denkbar. Eine im zellfreien System stattfindende Bildung von ROS durch SWCNTs wurde auch in einer Studie von Ren et al. [2009] festgestellt. Hierbei konnte die Entstehung von Peroxidradikalen ($\text{ROO}^\bullet$) in wässriger Lösung nachgewiesen werden. Als Grund für diese Beobachtung wurde die Adsorption von Luftsauerstoff an die Oberfläche der SWCNTs angenommen, da nach Opsonierung der Röhrenoberfläche keine Radikale detektiert werden konnten. Die Identifizierung der Peroxidradikale erfolgte mithilfe der Methode der Kapillarelektrophorese unter Anwendung von 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH).

DCFH entsteht aus dem eingesetzten DCFH-DA entweder enzymatisch nach dessen Deacetylierung durch Esterasen, was allerdings zelluläre Bedingungen erfordert, oder mittels einer Aktivierung im alkalischen Milieu (nach Verseifung von DCFH-DA mit Natronlauge). Diese Möglichkeiten treffen jedoch auf die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht zu, da zellfrei und unter physiologischen Bedingungen inkubiert wurde. In einer Studie von Kalinich et al. [1997] wurde eine Deacetylierung von DCFH-DA zu DCFH bei physiologischem pH-Wert festgestellt. In Anbetracht dieser Beobachtung könnte davon ausgegangen werden, dass DCFH-DA unter physiologischen Bedingungen zu DCFH deacetyliert wird und durch Adsorption von

Luftsauerstoff an die katalytische Oberfläche von SWCNTs ROS entstehen, welche wiederum DCFH zum fluoreszierenden DCF umsetzen. Dies würde eine zellfreie bzw. extrazelluläre Bildung von ROS untermauern. Damit stellt sich jedoch die Frage, inwieweit das Fluoreszenzsignal im DCF-Assay unter zellulären Bedingungen von einer intrazellulären ROS-Bildung durch in die Zelle aufgenommene SWCNTs herrührt. Angesichts der Tatsache, dass der Überschuss an DCFH-DA im Verlauf der Durchführung des DCF-Assays durch mehrfaches standardisiertes Waschen des Inkubationsgefäßes entfernt wird, bevor die Testsubstanz aufgegeben wird und der internalisierte Farbstoff nach Deacetylierung in Form von DCFH in der Zelle verbleiben sollte, wäre von einer intrazellulären ROS-Bildung auszugehen. Zusätzlich durchgeführte Untersuchungen mittels DCF-Assay mit HT29-Zellen ohne und mit Zusatz von Katalase zeigten jedoch einen Rückgang der Fluoreszenzintensität nach Zugabe des H_2O_2 -abbauenden Enzyms (siehe Abb. 4.12). Da eine zelluläre Aufnahme der Katalase aufgrund ihrer Größe unwahrscheinlich ist [Huang et al., 1994], deutet dieses Ergebnis auf eine extrazelluläre Bildung von H_2O_2 hin. Jedoch existieren Studien, die eine Diffusion von H_2O_2 durch die Zellmembran mithilfe sog. Aquaporine, zeigen [Bienert et al., 2006; Henzler und Steudle, 2000]. Auf diese Annahme stützen sich auch die Ergebnisse von Huang et al. [1994], in deren Studie ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im DCF-Assay nach Zugabe von Katalase festzustellen war. Dies würde zudem erklären, warum das Fluoreszenzsignal im DCF-Assay nach Inkubation mit der Positivkontrolle Menadion durch Zugabe von Katalase ebenfalls erniedrigt wurde (siehe Abb. 4.12), wenngleich die Möglichkeit besteht, dass Menadion auch extrazellulär zur Bildung von H_2O_2 beiträgt [Yamashoji, 2008]. Derartige Überlegungen setzen jedoch voraus, dass entweder das überschüssige DCFH-DA nicht vollständig entfernt wird oder DCFH möglicherweise aus der Zelle ins Zellkulturmedium diffundiert. Ein trotz mehrfachen Waschens zurückbleibender Rest an DCFH-DA würde auch die deutlich höhere und bereits bei niedrigeren Konzentrationen einsetzende Fluoreszenzzunahme im zellfrei durchgeführten DCF-Assay im Vergleich zu den unter zellulären Bedingungen erhaltenen Ergebnissen erklären.

Auffällig ist allerdings, dass die Fluoreszenzintensitäten nach Zusatz von Katalase nach allen Inkubationszeiten in der jeweiligen Konzentration vergleichbar waren (siehe Abb. 4.12), während die Fluoreszenzintensitäten der Katalase-unbehandelten Proben mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich abnahmen. Demnach war keine anteilige Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Katalase zu beobachten. Des Weiteren war in Untersuchungen zur Entstehung von H_2O_2 durch SWCNTs keine Bildung dieser reaktiven Sauerstoffspezies festzustellen (siehe Abb. 4.13). Zudem wird in der Literatur beschrieben, dass zur Erfassung von H_2O_2 Peroxidasen, Cytochrom C oder Fe^{2+} erforderlich sind [Jakubowski und Bartosz, 2000]. Durch diese Beobachtungen werden die vorherig beschriebenen Ergebnisse wiederum in Frage gestellt und führen zu der Überlegung, dass aufgrund einer möglicherweise vorhandenen Interaktion zwischen den SWCNTs, dem Farbstoff und der Katalase oder auch mit Bestandteilen des Zellkulturmediums artifizielle Ergebnisse generiert wurden. Eine mögliche Erklärung für die abnehmende Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Katalase ist eine Abschirmung der SWCNTs durch Adsorption des Enzyms an deren Oberfläche, womit weniger Farbstoff durch das Nanomaterial umgesetzt würde. Da allerdings

serumhaltig inkubiert wurde (10 % FKS), ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich.

Insgesamt betrachtet sind die Ergebnisse der durchgeführten DCF-Assays kontrovers und erlauben keine eindeutige Aussage hinsichtlich einer den zellulären ROS-Gehalt modulierenden Wirkung von den in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs. Zudem wird die Aussagekraft des DCF-Assays in der Literatur diskutiert. Zum Einen oxidiert DCFH in einer sauerstoffhaltigen Lösung spontan [Jakubowski und Bartosz, 2000]. Zum Anderen kann DCF von zellulären Reduktasen mittels Eielektronenübertragung in ein radikalische Semichinon überführt werden. Dieses kann das freie Elektron auf O_2 übertragen, sodass Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) gebildet wird. $O_2^{\bullet-}$ kann dann zur Oxidation von DCFH beitragen und führt somit zu einer Selbstverstärkung der Messung. Ebenso kann DCFH durch intrazelluläre Peroxidasen oder Lichteinstrahlung in das radikalische Semichinon überführt werden und zur Bildung von $O_2^{\bullet-}$ beitragen [Marchesi et al., 1999]. Eine Interaktion zwischen SWCNTs und DCFH-DA ist bisher in der Literatur jedoch nicht beschrieben. Des Weiteren existieren im Zusammenhang mit SWCNTs keine Studien zur Beeinflussung des nukleären Nrf2-Gehalts. Aus diesen Gründen können derzeit aus der bestehenden Literatur keine Rückschlüsse über die hier erlangten Erkenntnisse gezogen werden. Aufgrund der schwachen Beeinflussung sowohl des Nrf2- als auch des GSH-Gehalts ist eine den zellulären Redoxstatus beeinflussende Wirkung der SWCNTs jedoch denkbar. Ob die im DCF-Assay beobachtete Fluoreszenzzunahme auf eine SWCNT-induzierte ROS-Produktion zurückzuführen ist bzw. das auf einer Modulation des ROS-Gehalts basierende Fluoreszenzsignal durch eine Interaktion zwischen dem Nanomaterial und dem Farbstoff überdeckt wird und um welche Art von ROS es sich dabei handeln könnte, muss durch weitere Untersuchungen festgestellt werden. Eine dazu geeignete Methode stellt bspw. die Elektronen-Spin-Resonanz(ESR)-Spektroskopie dar, durch die Sauerstoffspezies anhand der für diese spezifischen Spektren identifiziert werden können.

4.1.5 Genotoxisches Potential von SWCNTs

Zur Erfassung des genotoxischen Potentials der in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs wurde eine Kombination verschiedener Untersuchungen herangezogen. Damit sollten, gerade im Hinblick auf das ungewöhnliche und größtenteils noch unzureichend charakterisierte Verhalten nanostrukturierter Materie, falsch positive bzw. negative Ergebnisse ausgeschlossen und zudem ein umfassenderes Bild über die Art des genetischen Schadens gewonnen werden. Daher wurden neben der Erfassung einer DNA-strangbrechenden Wirkung der SWCNTs auch Untersuchungen zur Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 sowie zur Induktion von Mikrokernen durchgeführt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die nach Exposition gegenüber SWCNTs beobachtete DNA-Schädigung durch das Nanomaterial selbst hervorgerufen wird oder auf der Induktion apoptotischer Prozesse beruht.

4.1.5.1 DNA-strangbrechende Eigenschaften von SWCNTs

Die DNA-strangbrechenden Eigenschaften von SWCNTs in HT29-Zellen wurden mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach Substanzin-

kubation in ein Agarosegel eingebettet und auf Objektträger aufgebracht. Nach anschließender Lyse, Elektrophorese und Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid erfolgte die computergestützte Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (siehe Abschnitt 5.12.1). Dabei wurde der Comet Assay in zwei unterschiedlichen Modifikationen durchgeführt: Unter alkalischen Elektrophoresebedingungen mit FPG-Behandlung sowie mit Elektrophorese unter neutralen Bedingungen. Während neutrale Elektrophoresebedingungen die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen ermöglichen, erlaubt ein alkalischer pH-Wert ($\text{pH} \geq 13$) die Erfassung weiterer DNA-Modifikationen, wie DNA-Einzelstrangbrüche, apurine und apyrimidine Stellen (AP-Stellen) sowie DNA/Protein- und DNA/DNA-Quervernetzungen [Tice et al., 2000]. Durch die zusätzliche Behandlung mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) können zudem oxidative DNA-Schäden, basierend auf FPG-sensitiven Stellen, erfasst werden (siehe Abschnitt 2.7.1). Diese werden aus dem DNA-Rückgrat herausgeschnitten und in DNA-Einzelstrangbrüche überführt, wodurch die DNA-Strangbruchrate FPG-behandelter Proben im Vergleich zu den FPG-unbehandelten erhöht ist [Speit et al., 2004].

Als Auswertungsparameter für die DNA-strangbrechende Wirkung der Testsubstanz wurde die sog. Schweifintensität („tailintensity“) herangezogen. Dieser Begriff beschreibt das relative Verhältnis der Intensität des Kometenschweifs zu der des Kometenkopfs. Dabei nimmt mit zunehmender Fragmentierung der DNA einer Zelle die Menge an DNA im Schweif und folglich auch die Schweifintensität zu (siehe Abschnitt 5.12.1).

Der Comet Assay unter alkalischen Elektrophoresebedingungen mit FPG-Behandlung wurde nach 3- und 24-stündiger Inkubation, der Comet Assay mit Elektrophorese bei neutralem pH-Wert nach 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs durchgeführt. Zur grafischen Darstellung der DNA-strangbrechenden Wirkung wurden jeweils die prozentualen Schweifintensitäten der einzelnen Proben gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen. Die Positivkontrollen wurden entsprechend der jeweiligen Fragestellung gewählt und sind bei der Beschreibung der einzelnen Ergebnisse aufgeführt. Die Abbildungen 4.21 und 4.22 zeigen die Ergebnisse der Comet Assays unter alkalischen Elektrophoresebedingungen nach 3- und 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs. Die in den grafischen Darstellungen gezeigten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf einen Vergleich von FPG-unbehandelten und -behandelten Proben. Die für beide Inkubationszeiträume berechneten signifikanten Unterschiede zwischen den Schweifintensitäten SWCNT-behandelter Proben und der NaC-Kontrolle sowie signifikante Unterschiede zwischen den nach 3- und 24-stündiger Expositionsdauer ermittelten Schweifintensitäten sind in Tab. 4.1 aufgeführt.

Als Positivkontrolle diente jeweils die Behandlung mit ultravioletter Strahlung (UV-B; = 312 nm; 2 min), die neben direkten DNA-Schäden (v.a. Thymindimere) auch indirekt über ROS-Generierung oxidative DNA-Schäden hervorruft.

Nach einer Inkubationszeit von 3 h führen SWCNTs zu einer leichten und ab einer Konzentration von 0,0001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (nach FPG-Behandlung ab einer Konzentration von 0,001 $\mu\text{g}/\text{ml}$) signifikanten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zur NaC-Kontrolle (siehe Abb. 4.21). Ein Unterschied in der Schweifintensität zwischen FPG-behandelten und -unbehandelten Proben ist im

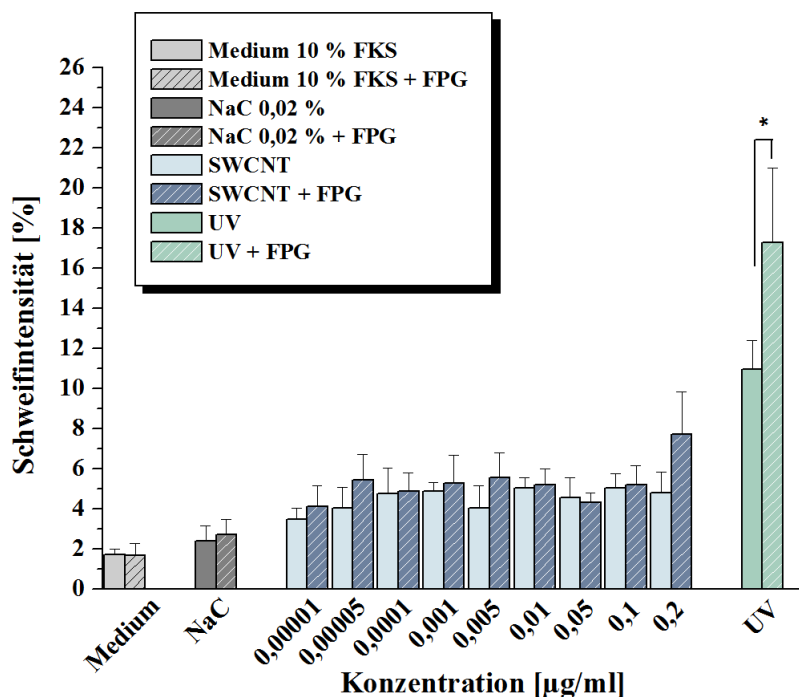


Abbildung 4.21: DNA-strangbrechende Wirkung von SWCNTs in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation, bestimmt mittels Comet Assay unter alkalischen pH-Bedingungen. Oxidativ modifizierte Basen wurden durch Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) bestimmt (schraffierte Balken). Ultraviolett (UV)-Bestrahlung (312 nm; 2 min) diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für SWCNTs = NaC, Signifikanzbezug für UV = Medium 10 % FKS) bzw. zwischen FPG-behandelten und -unbehandelten Proben wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$). $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

Konzentrationsbereich von $0,00001 - 0,1 \mu\text{g/ml}$ nicht festzustellen. Die Schweifintensitäten liegen hier unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten auf dem Niveau der nicht FPG-behandelten Proben. Lediglich in der höchsten getesteten Konzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=} 46,7 \text{ ng/cm}^2$) zeigt sich eine Zunahme der DNA-Strangbruchrate nach FPG-Behandlung. Diese ist jedoch nicht statistisch signifikant, so dass eine oxidative Schädigung der DNA durch SWCNTs in dem getesteten Konzentrationsbereich nicht anzunehmen ist. Auffällig ist, dass keinerlei Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte festzustellen ist. Vielmehr ist eine Art Plateau zu erkennen, in der Form dass die Schweifintensitäten über den gesamten Konzentrationsbereich vergleichbare Werte von 4 - 5 % aufweisen.

Die UV-Bestrahlung der Zellen als Positivkontrolle führt dagegen zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Strangbrüche (6,4-fache Erhöhung gegenüber der Medium-Kontrolle). Zudem bewirkt die Bestrahlung mit UV-Licht bei zusätzlicher FPG-Behandlung erwartungsgemäß eine Zunahme der Schweifintensität gegenüber der nicht FPG-behandelten UV-Kontrolle, was auf oxidative DNA-Schäden hinweist.

Eine 24-stündige Exposition von HT29-Zellen gegenüber SWCNTs bewirkt in einem Konzen-

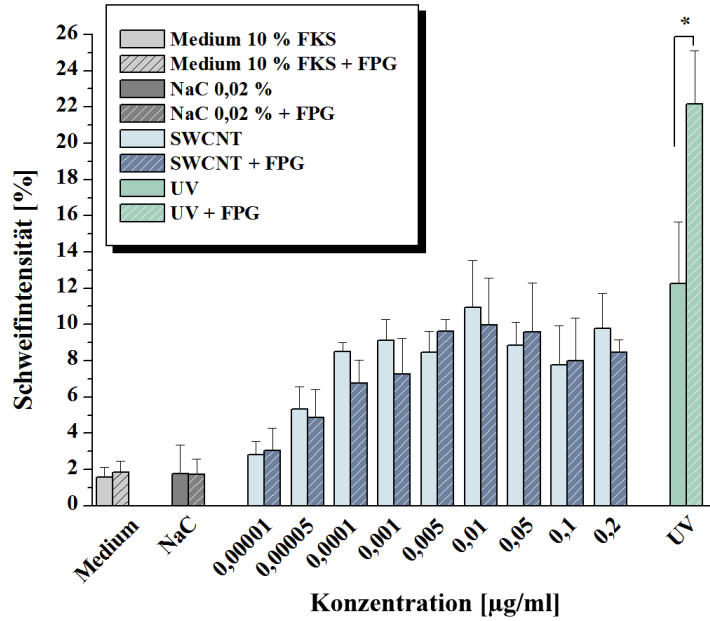


Abbildung 4.22: DNA-strangbrechende Wirkung von SWCNTs in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation, bestimmt mittels Comet Assay unter alkalischen pH-Bedingungen. Oxidativ modifizierte Basen wurden durch Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) bestimmt (schraffierte Balken). Ultraviolett(UV)-Bestrahlung (312 nm; 2 min) diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD nach Ausreißerbereinigung (Nalimov) von sechs unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für SWCNTs = NaC, Signifikanzbezug für UV = Medium 10 % FKS) bzw. zwischen FPG-behandelten und -unbehandelten Proben wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$). $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

trationsbereich von $0,00005 - 0,2 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=} 0,01 - 46,7 \text{ ng/cm}^2$) eine signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zur NaC-Kontrolle (0,02 %) (siehe Abb 4.22).

Dabei ist die Strangbruchrate in der zweitniedrigsten Konzentration von $0,00005 \mu\text{g/ml}$ mit einer Schweifintensität von $(5,3 \pm 1,2) \%$ bereits 3-fach höher als die der NaC-Kontrolle. Bei einer Konzentration von $0,01 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=} 2,3 \text{ ng/cm}^2$) wird mit einer Schweifintensität von $(10,9 \pm 2,6 \%)$ die stärkste DNA-strangbrechende Wirkung erreicht. Im weiteren Konzentrationsverlauf ist eine leichte Abnahme der DNA-Strangbruchrate zu beobachten, wobei die höchste Konzentration ($0,2 \mu\text{g/ml}$) diesem rückläufigen Trend nicht zu folgen scheint, da hier die Schweifintensität mit $(9,8 \pm 1,9) \%$ nahezu auf Höhe des Maximums liegt.

Die Bestrahlung der Zellen mit UV-B-Licht führt ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Strangbruchrate (7,8-fache Erhöhung gegenüber der Medium-Kontrolle), welche nach FPG-Behandlung zusätzlich erhöht ist. Nach Behandlung der mit SWCNTs inkubierten Zellen mit FPG ist jedoch keine weitere Zunahme der DNA-Strangbrüche zu beobachten. Die Schweifintensitäten liegen über den gesamten Konzentrationsbereich ($0,00001 - 0,2 \mu\text{g/ml}$) unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten auf dem Niveau der nicht FPG-behandelten Zellen. Somit ist auch nach 24-stündiger Inkubationsdauer nicht von einer oxidativen Schädigung der DNA durch SWCNTs auszugehen.

Tabelle 4.1: Übersicht über die Signifikanzen der Schweifintensitäten SWCNT-behandelter Proben in Bezug zur Schweifintensität der NaC-Kontrolle nach 3- und 24-stündiger Expositionsdauer (jeweils mit und ohne FPG-Behandlung), sowie signifikante Unterschiede zwischen den nach 3- und 24-stündiger Expositionsdauer ermittelten Schweifintensitäten (jeweils zwischen den FPG-behandelten Proben bestimmt), berechnet mittels Student's *t*-Test. $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	3 h Inkubation		24 h Inkubation		3 h / 24 h
	ohne FPG	mit FPG	ohne FPG	mit FPG	mit FPG
0,00001	-	-	-	-	-
0,00005	-	-	**	**	-
0,0001	-	*	***	***	*
0,001	**	*	***	***	*
0,005	-	*	***	***	**
0,01	**	**	***	***	**
0,05	*	*	***	***	*
0,1	*	*	**	***	-
0,2	*	*	**	***	-
UV	**	**	***	***	

Verglichen mit der 3-stündigen Expositionsdauer ist die DNA-Strangbruchrate nach einer Inkubation von 24 h deutlich erhöht, wobei im Konzentrationsbereich von $0,0001 - 0,05 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=} 0,02 - 11,7 \text{ ng/cm}^2$) statistische Signifikanz erreicht wird (siehe Tab. 4.1).

Um die im alkalischen Comet Assay detektierten DNA-Schäden näher zu charakterisieren, wurde im weiteren Untersuchungsverlauf der Comet Assay mit neutralen Elektrophoresebedingungen angewandt. Diese Vorgehensweise erfolgte nach Singh et al. [1988], wonach der neutrale Comet Assay ausschließlich den Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen ermöglicht. Diese Schlussfolgerung basiert darauf, dass DNA bei neutralem pH-Wert als Doppelstrang vorliegt und eine DNA-Migration während der Elektrophorese überwiegend in Regionen mit DNA-Doppelstrangbrüchen vorkommt. Im Vergleich mit den Ergebnissen des Comet Assays unter alkalischen Bedingungen kann dann eine Aussage bezüglich der Art des beobachteten DNA-Schadens getroffen werden.

Die Ergebnisse des Comet Assays unter neutralen Elektrophoresebedingungen nach 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs sind in Abb. 4.23 dargestellt.

Als Positivkontrolle des neutralen Comet Assays wurde Etoposid (ETO, siehe Abb. 4.24) in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ eingesetzt. Etoposid ist ein Topoisomerase-II-Gift, d. h. es stabilisiert den Enzym-DNA-Komplex und führt in der Folge zu einer erhöhten Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen.

Wie in Abb. 4.23 zu sehen, ist im gesamten Konzentrationsbereich ($0,00005 - 0,2 \mu\text{g/ml}$) der untersuchten SWCNTs keine Erhöhung der Schweifintensität festzustellen. Die gemittelten Schwei-

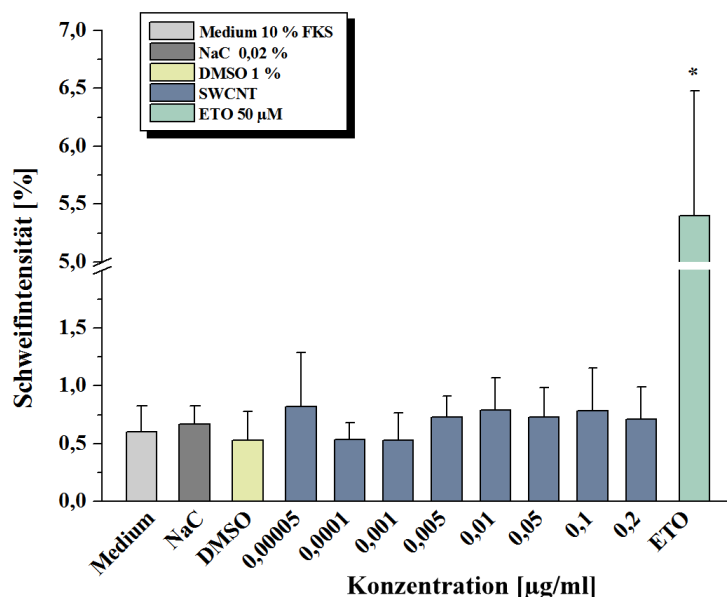


Abbildung 4.23: DNA-strangbrechende Wirkung von SWCNTs in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation, bestimmt mittels Comet Assay unter neutralen pH-Bedingungen (A.Rechel, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2009). Etoposid (ETO, 50 µM) diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Versuchen. Der signifikante Unterschied der Positivkontrolle ETO zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) wurde mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$). $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

Intensitäten der Medium- sowie der beiden Lösungsmittelkontrollen (NaC 0,02 %; DMSO 1 %) variieren zwischen 0,5 und 0,7 %, die der SWCNT-behandelten Zellen zwischen 0,5 und 0,8 %. Die mittlere Schweifintensität der Positivkontrolle ETO beträgt $(5,4 \pm 1,1) \%$ und ist somit signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 1 %) erhöht.

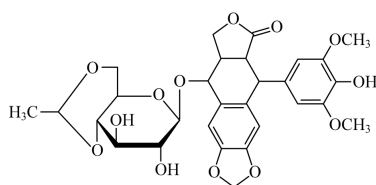


Abbildung 4.24: Struktur von Etoposid (ETO).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass SWCNTs unter den Bedingungen des alkalischen Comet Assays sowohl nach 3- als auch nach 24-stündiger Inkubationsdauer DNA-Strangbrüche induzieren. Dabei nimmt die DNA-Strangbruchrate mit zunehmender Inkubationszeit deutlich zu. Nach Behandlung der mit SWCNTs inkubierten Zellen mit dem DNA-Reparaturenzym FPG sind keine zusätzlichen DNA-Strangbrüche festzustellen, so dass eine oxidative Schädigung der DNA durch SWCNTs innerhalb der genannten Expositionszeiträume nicht anzunehmen ist. Eine Durchführung des Comet Assays unter neutralen Elektrophoresebedingungen nach 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit SWCNTs zeigt indes keine DNA-schädigende Wirkung des

Nanomaterials. In Anbetracht dieser Ergebnisse tragen DNA-Doppelstrangbrüche nicht zu der im alkalischen Comet Assay festgestellten DNA-Strangbruchrate bei.

Eine auf einer Beeinflussung der Viabilität von HT29-Zellen basierende Erhöhung der DNA-Strangbruchraten kann aufgrund zu jedem Versuch parallel durchgeführten Viabilitätsuntersuchungen ausgeschlossen werden. Die mittels Trypanblau-Ausschluss ermittelten Viabilitäten lagen sowohl für die mit SWCNTs als auch für die mit der jeweiligen Positivkontrolle (alkalischer Comet Assay: UV-Bestrahlung; neutraler Comet Assay: ETO) behandelten Zellen unabhängig von der jeweiligen Inkubationszeit oberhalb von 80 % (Daten nicht gezeigt).

4.1.5.2 Modulation des Phosphorylierungsstatus des Tumorsuppressorproteins p53 durch SWCNTs

Die Entstehung von DNA-Strangbrüchen stellt einen Stimulus für die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 dar [Nelson und Kastan, 1994]. Dabei wird p53 durch posttranslationale Modifizierung, wie Phosphorylierung oder Acetylierung, stabilisiert und aktiviert. Daraus resultiert eine erhöhte Halbwertszeit [Liu et al., 1994; Muralidhar et al., 1996] und Akkumulation des Proteins im Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor durch Wechselwirkung mit dem sog. „p53 responsiven Element“ spezifische Zielgene transaktiviert, welche in Abhängigkeit vom Grad des DNA-Schadens den Zellzyklusarrest initiieren, an der DNA-Reparatur teilnehmen oder gegebenenfalls die Apoptose einleiten [Helton und Chen, 2007; Offer et al., 1999; Zhou et al., 2001] (siehe Abschnitt 2.7.2).

Um die Ergebnisse des unter alkalischen Bedingungen durchgeführten Comet Assays weiter zu bekräftigen, wurde die Modulation des Phosphorylierungsstatus des Tumorsuppressorproteins p53 (p-p53) durch SWCNTs untersucht. Hierzu wurden HT29-Zellen in Anlehnung an die Inkubationsbedingungen des Comet Assays für 3 und 24 h gegenüber SWCNTs exponiert und der Gehalt an phosphoryliertem p53 (Serin 15) mittels Western Blot Analyse und anschließender immunochemischer Detektion bestimmt. α -Tubulin wurde als Beladungskontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde Hydroxyharnstoff („hydroxyurea“, HU; siehe Abb. 4.25) in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. HU ist ein Zytostatikum, das insbesondere bei malignen Bluterkrankungen wie u.a. Leukämie Einsatz findet.

Die (p-p53)-Gehalte der Proben und der jeweiligen Kontrolle (Kontrolle für SWCNTs = NaC 0,02 %, Kontrolle für HU = Medium 10 % FKS) wurden zueinander in Bezug gesetzt und der prozentuale (p-p53)-Gehalt als (T/C) in [%] gegen die getesteten Konzentrationen grafisch aufgetragen. Abbildung 4.26 zeigt das Ergebnis der 3-stündigen Inkubation mit SWCNTs.

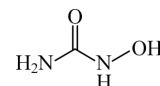


Abbildung 4.25: Struktur von Hydroxyharnstoff (HU).

Nach 3-stündiger Exposition ist bis zu einer Konzentration von 0,005 $\mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ 1,2 ng/cm^2) eine konzentrationsabhängige Zunahme der Phosphorylierung von p53 festzustellen. Bei genann-

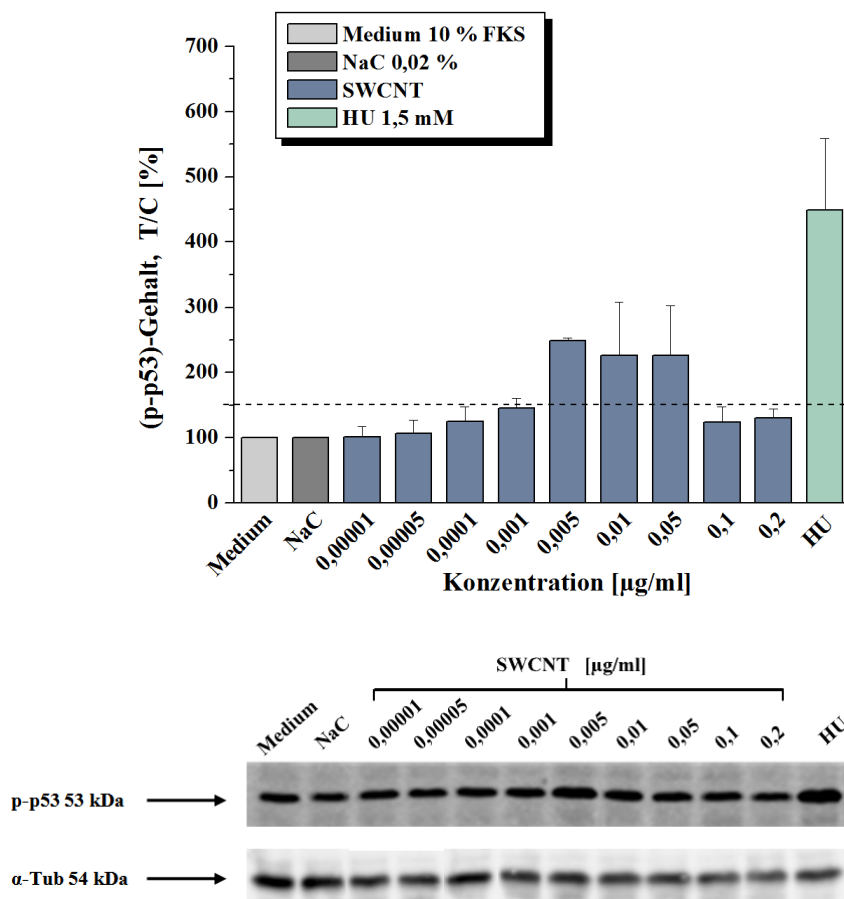


Abbildung 4.26: Phosphorylierungsstatus von p53 in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit SWCNTs, bestimmt mittels Western Blot Analyse. Hydroxyharnstoff (HU; 1,5 mM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD und repräsentative Blotbilder von sechs unabhängigen Versuchen in Relation zur jeweiligen Kontrolle (Kontrolle für SWCNTs = NaC 0,02 %, Phosphorylierung von p53 = 100 %; Kontrolle für HU = Medium 10 % FKS, Phosphorylierung von p53 = 100 %). 0,1 µg/ml $\hat{=}$ 23,4 ng/cm².

ter Konzentration ist der Phosphorylierungsstatus des Proteins auf (249 ± 4) % gegenüber der Kontrolle (NaC 0,02%) erhöht. Mit zunehmender Konzentration nimmt der Gehalt an phosphoryliertem p53 ab und erreicht bei der höchsten getesteten SWCNT-Konzentration von 0,2 µg/ml ($\hat{=}$ 46,7 ng/cm²) einen Wert von (130 ± 13) %. Eine Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle HU führt erwartungsgemäß zu einem deutlichen Anstieg des p53-Phosphorylierungsstatus auf (449 ± 110) % gegenüber der zugehörigen Lösungsmittelkontrolle (Medium 10 % FKS).

Eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 24 h bewirkt ebenfalls eine Zunahme des Phosphorylierungsstatus von p53 (siehe Abb. 4.27). Dabei ist ein der 3-stündigen Inkubation identischer Effektverlauf zu beobachten. Bis zu einer Konzentration von 0,005 µg/ml steigt der Gehalt an phosphoryliertem p53 konzentrationsabhängig an, erreicht dort sein Maximum um anschließend wieder abzunehmen.

Ein Vergleich der (p-p53)-Gehalte nach 3- und 24-stündiger Exposition der HT29-Zellen gegen-

über SWCNTs zeigt, dass sich die beobachteten Effekte mit zunehmender Inkubationszeit leicht verstärken. Insbesondere bei einer Konzentration von 0,005 $\mu\text{g/ml}$ ist nach 24 h eine deutliche Phosphorylierungszunahme von p53 festzustellen. So liegt der (p-p53)-Gehalt in dieser Konzentration nach 24 h bei $(303 \pm 45) \%$, während nach 3-stündiger Inkubation ein Wert von $(249 \pm 4) \%$ ermittelt wurde.

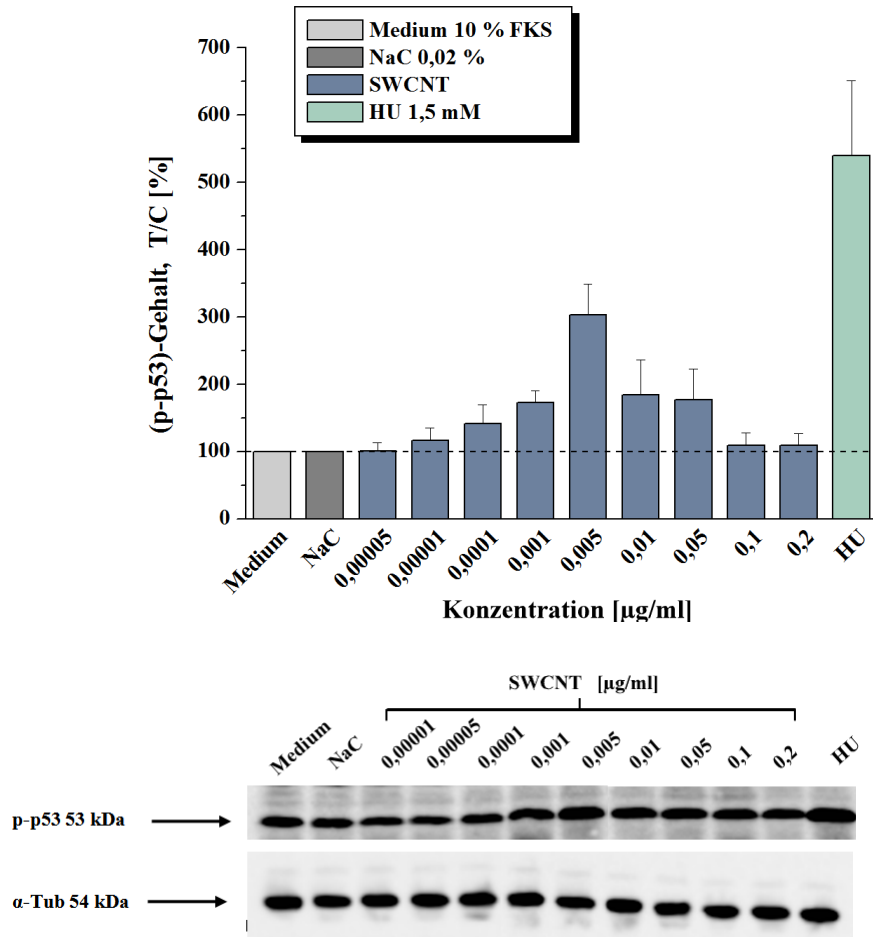


Abbildung 4.27: Phosphorylierungsstatus von p53 in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit SWCNTs, bestimmt mittels Western Blot Analyse. Hydroxyharnstoff (HU; 1,5 mM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD und repräsentative Blotbilder von fünf unabhängigen Versuchen in Relation zur jeweiligen Kontrolle (Kontrolle für SWCNTs = NaC 0,02 %, Phosphorylierung von p53 = 100 %; Kontrolle für HU = Medium 10 % FKS, Phosphorylierung von p53 = 100 %). $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

4.1.5.3 Induktion von Apoptose durch SWCNTs

Eine Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 kann, wie bereits erläutert, neben dem Zellzyklusarrest oder der Aktivierung spezifischer DNA-Reparaturmechanismen auch die Einleitung der Apoptose zur Folge haben [Helton und Chen, 2007; Offer et al., 1999; Zhou et al., 2001] (siehe Abschnitt 2.7.2). Um zu untersuchen, ob die nach 24-stündiger Expositionsdauer gegenüber SWCNTs in HT29-Zellen festgestellte DNA-Schädigung durch das untersuchte Nanomaterial selbst hervorgerufen wird oder vielmehr aus der Induktion apoptotischer Prozesse resultiert, wurde die für letztere charakteristische Fragmentierung der DNA bestimmt. Im Verlauf der apoptotischen Signalkaskade aktiviert Caspase-3 die Endonuklease CAD („caspase activated DNase“). Endonukleasen spalten die DNA zwischen den Nukleosomen, wodurch Fragmente von ca. 180 kDa entstehen. Diese Fragmente, bestehend aus DNA und Histonen, wurden mit einem Sandwich-ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) durch Einsatz monoklonaler Antikörper gegen DNA-Fragmente und Histone nachgewiesen (siehe Abschnitt 5.13). Abbildung 4.28 zeigt das Ergebnis einer 24-stündigen Inkubation mit SWCNTs.

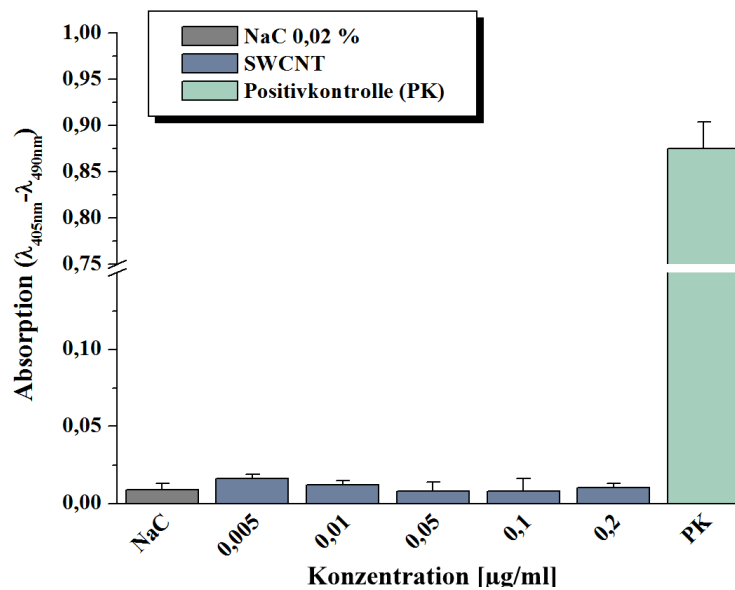


Abbildung 4.28: Fragmentierte DNA in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation SWCNT, bestimmt mittels „Cell Death Detection ELISA^{Plus}“ von Roche [A. Rechel, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2009]. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD der Absorption abzüglich des Hintergrunds von einem Experiment in einer Dreifachbestimmung. $0,1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 23,4 \text{ ng/cm}^2$.

Als Positivkontrolle wurde der im Kit mitgelieferte DNA-Histon-Komplex (PK) verwendet. In der grafischen Darstellung sind die Absorptionen der NaC-Kontrolle (0,02 %), der mit SWCNTs behandelten Proben und der Positivkontrolle abzüglich des Hintergrunds dargestellt. Eine 24-stündige Inkubation mit SWCNTs bewirkt über den gesamten Konzentrationsbereich (0,005 - 0,2 µg/ml) keinen Anstieg des Gehalts an fragmentierter DNA, was zu der Annahme führt, dass keine apoptotischen Prozesse bei der untersuchten Inkubationsdauer auftreten.

Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die nach 24-stündiger Exposition gegenüber SWCNTs festgestellte Erhöhung der DNA-Strangbruchrate in HT29-Zellen nicht auf eine DNA-Fragmentierung infolge apoptotischer Mechanismen zurückzuführen ist.

Die Angaben in der Literatur in Bezug auf Apoptose-Induktion durch SWCNTs ergeben ein uneinheitliches Bild. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit deckt sich z. B. mit dem Ergebnis von Jacobsen et al. [2008]. Eine 24-stündige Inkubation von Lungenepithelzellen der Maus mit SWCNTs ($\emptyset$: 0,9 - 1,7 nm, Länge: $< 1 \mu\text{m}$, 2 wt.% Fe) in Konzentrationen $\leq 200 \mu\text{g/ml}$ löste keine apoptotischen Prozesse aus. Andererseits konnten Tian et al. [2006] an Humanfibroblasten bereits nach 18-stündiger Inkubation mit aufgereinigten SWCNTs ($\emptyset$: 2 nm, Länge: 500 nm) der Konzentration $25 \mu\text{g/ml}$ einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate nachweisen. Obwohl Ähnlichkeiten zu der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung (gleiche Dimensionen der SWCNTs, gleiches Testsystem) bestehen, unterscheiden sich die Ergebnisse. Dies könnte zum Einen am Konzentrationsunterschied liegen und zum Anderen auf unterschiedliche Sensitivitäten der untersuchten Zelllinie zurückzuführen sein.

4.1.5.4 Induktion von Mikrokernen durch SWCNTs

Neben der Apoptose-Induktion verfügt die Zelle über weitere spezifische Mechanismen, um den Folgen einer DNA-Schädigung entgegen zu wirken. So können, wie bereits erwähnt, in Abhängigkeit der Art und Schwere des DNA-Schadens der Zellzyklus arretiert und entsprechende DNA-Reparaturmechanismen angeschaltet werden. Ist dies nicht der Fall, wird der genetische Schaden an die nächste Zellgeneration weitergegeben, was mit schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen verbunden sein kann.

Vor dem Hintergrund der in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Ergebnisse sollte nachfolgend das mutagene Potential von SWCNTs unter Anwendung des Mikrokern („micro-nuclei“, MN)-Tests abgeschätzt werden. Der MN-Test ist ein standardisierter Genotoxizitäts- bzw. Mutagenitätstest, durch den Veränderungen des genetischen Materials nach vollzogener Mitose in Form von sog. Mikrokernen erfasst werden. Als Mikrokern werden chromatinhaltige Partikel bezeichnet, die nach der Zellteilung nicht in einen der Tochterkerne integriert werden und somit aus den Zellkernen verloren gehen (siehe Abschnitt 2.7.3). Zur Unterscheidung zwischen einer aneugenen (Verlust ganzer Chromosomen) und klastogenen (Verlust von Chromosomenfragmenten) Wirkung des zu untersuchenden Materials wird eine immunologische Fluoreszenzmarkierung von Kinetochorproteinen durchgeführt.

Als Zellmodell wurden V79-Zellen gewählt, da diese aufgrund ihrer Verdopplungszeit und einer geringen spontanen Mikrokernrate bevorzugt für den MN-Test vorgeschlagen werden. Zudem haben sich HT29-Zellen in Vorversuchen bedingt durch ihre morphologischen Charakteristika und Unempfindlichkeit gegenüber gängigen Positivkontrollen als ungeeignet erwiesen.

Zur Bestimmung der MN-Induktion durch SWCNTs wurden die V79-Zellen auf Objektträger (OT) ausgestreut, über einen Zeitraum von 24 h mit dem Nanomaterial inkubiert und im Anschluss für 6 h substanzfrei nachinkubiert. Darauf folgte die Färbung mit fluoreszenzmarkierten

Antikörpern und die optische Auswertung mittels eines Fluoreszenzmikroskops. Pro OT wurden 2000 Zellen ausgezählt. Als Positivkontrolle diente 4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO, siehe Abb. 4.29), welches als Klastogen wirkt.

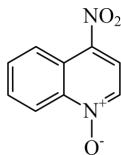


Abbildung 4.29: Struktur von 4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO).

Abbildung 4.30 zeigt repräsentative fotografische Aufnahmen fluoreszenzmarkierter HT29- (A) sowie V79-Zellen (B, C, D, E). Wie in den Bildern zu erkennen ist, weisen V79-Zellen (B) im Vergleich zu HT29-Zellen (A) ein langgestrecktes Tubulingerüst auf. Dies erlaubt eine eindeutige Identifizierung eines Mikrokerns (C), da ein „echter“ Mikrokern mit dem Tubulingerüst verankert sein muss. Aufgrund der kondensierteren Tubulinstruktur der HT29-Zellen ist eine eindeutige Zuordnung erschwert, weshalb diese Zelllinie u.a. nicht für die Bestimmung einer MN-Bildung durch SWCNTs herangezogen wurde. Die Aufnahmen D und E zeigen Mikrokern nach Behandlung der Zellen mit SWCNTs in einer Konzentration von 0,05 µg/ml (D) bzw. 0,3 µM NQO (E).

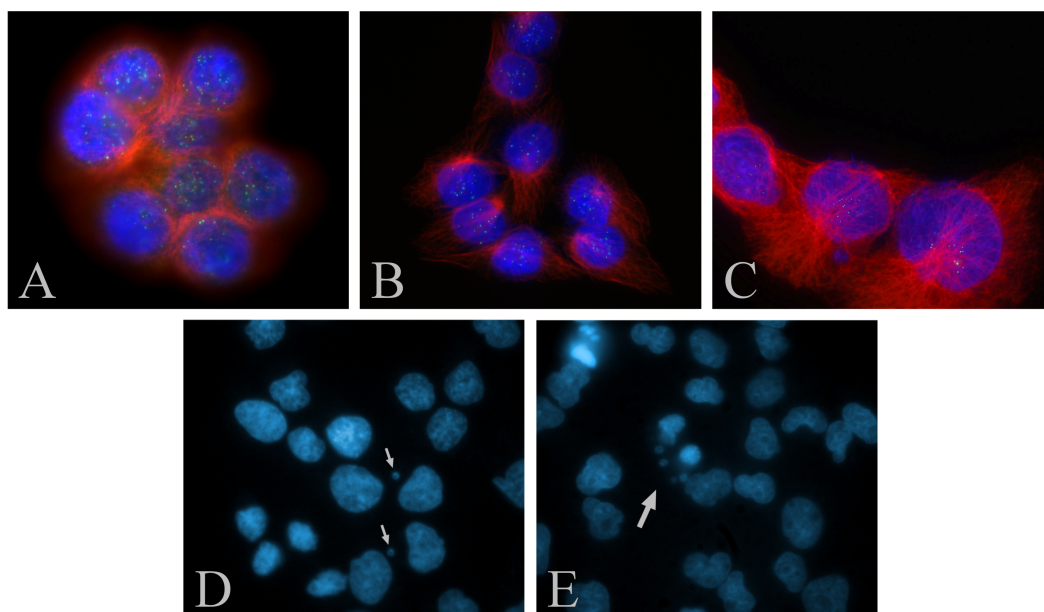


Abbildung 4.30: Fluoreszenzmarkiertes Erscheinungsbild der angefärbten Zellen; blau: DNA; grün: Kinetochore; rot: Mikrotubuli. A: unbehandelte HT29-Zellen [Dempe, 2009]; B und C: unbehandelte V79-Zellen [Dempe, 2009], D: MN (markiert mit Pfeilen) in V79-Zellen nach Inkubation mit SWCNTs einer Konzentration von 0,05 µg/ml; E: MN (markiert mit einem Pfeil) in V79-Zellen nach Inkubation mit 0,3 µM NQO.

Die Ergebnisse des MN-Tests mit SWCNTs sind in Abb. 4.31 dargestellt. Aufgetragen ist die Anzahl der kinetochor-positiven und -negativen Mikrokern pro 2000 ausgezählter Zellen gegen die getesteten SWCNT-Konzentrationen sowie die Negativkontrollen und die Positivkontrolle.

Nach Behandlung der V79-Zellen mit der Negativkontrolle NaC (0,02 %) ist für MN, die ganze

Chromosomen enthalten (kinetochor-positiv), eine spontane Mikrokernrate von 2 ± 1 zu beobachten während die Anzahl mikronukleierter Zellen mit Chromosomenfragmenten (kinetochor-negativ) im Mittel bei 7 ± 2 liegt. Eine Inkubation der Zellen mit SWCNTs für 24 h bewirkt im Konzentrationsbereich von 0,00005 - 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ 0,01 - 46,7 ng/cm^2) einen leichten jedoch gegenüber der NaC-Kontrolle (0,02 %) signifikanten Anstieg von kinetochor-negativen MN. Dabei nimmt die Häufigkeit dieser MN unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten zunächst bis zu einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ 11,7 ng/cm^2) zu, wo sie mit (22 ± 3) MN ein Maximum erreicht. Im weiteren Konzentrationsverlauf ist indes eine Abnahme der kinetochor-negativen MN zu verzeichnen, so dass bei der höchsten gemessenen Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ pro 2000 Zellen im Mittel (13 ± 2) MN, welche Chromosomenfragmente enthalten, zu beobachten sind. Die Häufigkeit von MN, die ganze Chromosomen aufweisen, bleibt indes über den gesam-

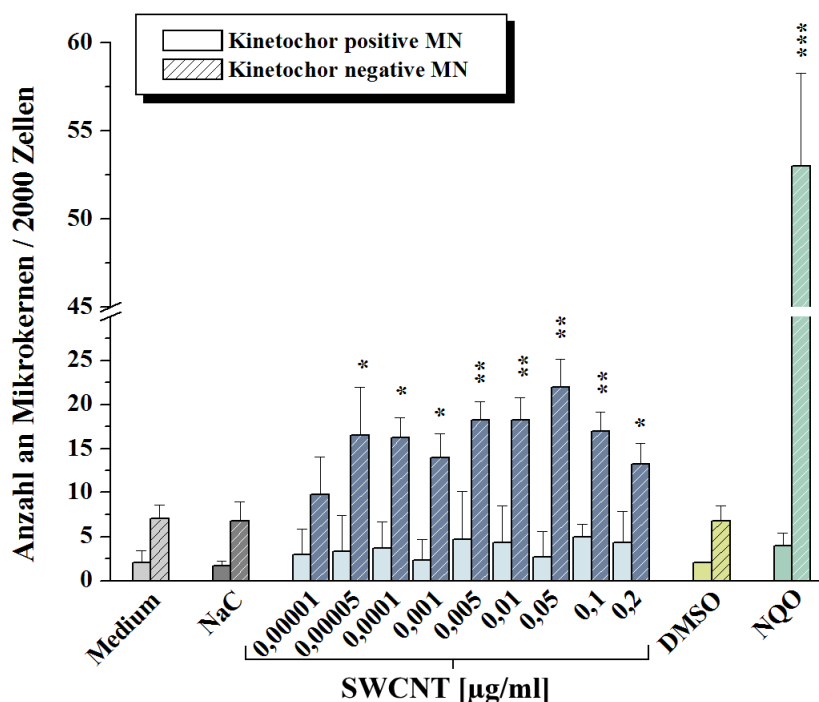


Abbildung 4.31: Induktion von Mikrokernen (MN) durch SWCNTs in V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation, bestimmt mittels Mikrokern (MN)-Test. Die unschraffierten Balken stellen die kinetochor-positiven, die schraffierten Balken die Kinetochor -negativen MN dar. 4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO; 0,3 μM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für SWCNTs = NaC, Signifikanzbezug für NQO = DMSO 1 %) wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). 0,1 $\mu\text{g/ml}$ $\hat{=}$ 23,4 ng/cm^2 .

ten Konzentrationsbereich (0,00001 - 0,2 $\mu\text{g/ml}$) nahezu auf dem Niveau der NaC-Kontrolle. So liegt die MN-Zahl der NaC-Kontrolle im Mittel bei 2 ± 1 , die der SWCNT-behandelten Zellen zwischen 2 und 4. Auch das klastogen wirkende NQO bildet erwartungsgemäß eine mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichbare Anzahl an kinetochor-positiven MN (4 ± 1 gegenüber 2 ± 0), führt jedoch zu einer deutlichen Zunahme von MN, die aus Chromosomenbruchstücken bestehen

(53 ± 5). Bezüglich der Beeinflussung der Mitoserate und der Morphologie des Tubulingerüsts von V79-Zellen durch SWCNTs konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop, ausgenommen der SWCNT-Konzentration von $0,005 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ $1,2 \text{ ng/cm}^2$), keine deutlichen Veränderungen gegenüber der NaC-Kontrolle beobachtet werden. Bei einer Konzentration von $0,005 \mu\text{g/ml}$ war die Mitoserate der V79-Zellen mit einer Anzahl von 16 ± 10 gegenüber der Kontrolle und den anderen SWCNT-Konzentrationen (Anzahl variierte zwischen 28 - 35 Mitosen) geringfügig erniedrigt, statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht.

4.1.5.5 Zusammenfassung und Diskussion der genotoxischen Eigenschaften von SWCNTs unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Zytotoxizität und Modulation des zellulären Redoxstatus

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs zeigten unter alkalischen pH-Bedingungen im Comet Assay nach 3-stündiger Expositionsdauer eine leichte DNA-strangbrechende Wirkung in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 (siehe Abb. 4.21). Diese setzte bereits bei einer SWCNT-Konzentration von $0,0001 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ $0,02 \text{ ng/cm}^2$) ein. Die DNA-schädigenden Eigenschaften nahmen mit steigender Inkubationszeit deutlich zu (siehe Abb. 4.22). Dabei zeigte sich die DNA-strangbrechende Wirkung bereits in Konzentrationen, in denen keine zytotoxischen Eigenschaften der SWCNTs zu beobachten waren (siehe Abb. 4.7). Während jedoch nach 3-stündiger Exposition der HT29-Zellen gegenüber SWCNTs kein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Integrität der DNA zu beobachten war, sondern sich ein Plateau ausbildete, nahmen die beobachteten Effekte nach einer Inkubation von 24 h zunächst bis zu einer Konzentration von $0,01 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=}$ $2,3 \text{ ng/cm}^2$) zu und verminderten sich leicht im weiteren Konzentrationsverlauf (siehe Abb. 4.22). Dabei ist die DNA-schädigende Wirkung nicht auf durch das DNA-Reparaturenzym FPG detektierbare oxidative Modifizierungen der DNA zurückzuführen, da sowohl nach 3- als auch nach 24-stündiger Expositionsdauer nach Behandlung der Proben mit FPG keine deutliche Erhöhung der DNA-Strangbruchrate festzustellen war. Lediglich in der höchsten getesteten SWCNT-Konzentration deutete sich nach einer Inkubationszeit von 3 h eine Erhöhung der Schweifintensität nach FPG-Behandlung an, diese war jedoch im Vergleich zur FPG-unbehandelten Probe nicht statistisch signifikant. Jedoch werden durch FPG nicht alle oxidativen DNA-Schäden erfasst, da das Enzym oxidierte Purinbasen prozessiert, während Pyrimidine bspw. vom Enzym NTH1, dem humanen Homolog des bakteriellen Nth Enzyms (Endonuklease III), erkannt werden [Morland et al., 2002]. Dennoch ist aufgrund der Ergebnisse der FPG-Behandlung ein Beitrag von auf FPG-Stellen basierenden oxidativen DNA-Schäden an der genotoxischen Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs nicht anzunehmen. Auch eine auf der Einleitung apoptotischer Prozesse nach SWCNT-Exposition beruhende Schädigung der DNA kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da nach 24-stündiger Inkubation der HT29-Zellen mit dem Nanomaterial über einen Konzentrationsbereich von $0,005 - 0,2 \mu\text{g/ml}$ keine für derartige Prozesse charakteristische Fragmentierung der DNA zu beobachten war (siehe Abb. 4.28).

Hinsichtlich der DNA-strangbrechenden Wirkung von SWCNTs existieren bislang nur wenige

Studien. Dennoch konnte eine derartige Wirkung bereits an verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Kisin et al. [2007] konnten mittels Comet Assay unter alkalischen pH-Bedingungen zeigen, dass SWCNTs in Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Strangbruchrate nach 24-stündiger Exposition führen. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich von 24 - 96 $\mu\text{g/ml}$. Die untersuchten SWCNTs wurden mittels Gasphasenabscheidung hergestellt und durch Säurebehandlung zur Entfernung von Metallkontaminanten aufgereinigt, sodass nur ein geringer Restgehalt an Eisen (0,23 wt.%) nachweisbar war. Der Durchmesser der Kohlenstoffnanoröhren variierte zwischen 0,4 und 1,2 nm, die Länge zwischen 1 und 3 μm . Jedoch wurden keine Untersuchungen zur Induktion von oxidativem Stress durchgeführt, weshalb nicht gesagt werden kann, ob die DNA-schädigenden Eigenschaften der von Kisin et al. [2007] untersuchten SWCNTs auf eine oxidative Schädigung der DNA zurückzuführen sind. Denn wenngleich die von Kisin et al. [2007] untersuchten SWCNTs mit einem metallischen Restgehalt von 0,23 wt.% als sehr rein einzustufen sind, existieren Studien, welche eine ROS-Bildung durch SWCNTs unabhängig von deren Reinheitsgrad nachweisen konnten [Yang et al., 2009]. Auch Lindberg et al. [2009] führten Untersuchungen zum genotoxischen Potential von SWCNTs an der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS 2B durch. Als Untersuchungsmethode wurde ebenfalls der Comet Assay unter alkalischen Elektrophoresebedingungen eingesetzt. Nach 24-stündiger Exposition konnte in dieser Studie eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Erhöhung der DNA-Schäden nachgewiesen werden. Diese zeigte sich bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 3,8 $\mu\text{g/ml}$ und erstreckte sich über den gesamten Konzentrationsbereich (bis 380 $\mu\text{g/ml}$). Das getestete Material bestand aus einer kommerziell erhältlichen Mischung aus $> 50 \%$ SWCNTs und $\sim 40 \%$ anderen Kohlenstoffnanoröhren, deren Maße $1,1 \text{ nm} \times 0,5 - 100 \mu\text{m}$ betrugen. Eine Analyse der CNTs mittels energiedisperser Röntgenspektroskopie (EDS) ergab einen Restgehalt katalytischer Metalle (Co und Mo) von $< 5 \%$, was mit dem Metallgehalt der in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs vergleichbar ist. Jedoch wurden in der Studie von Lindberg et al. [2009] ebenfalls keine Untersuchungen zur Modulation des zellulären Redoxstatus durch das untersuchte Nanomaterial durchgeführt, weshalb auch hier unklar ist, inwieweit oxidativer Stress am genotoxischen Potential der SWCNTs beteiligt war. Die Autoren äußerten lediglich die Vermutung eines Beitrags der metallischen Rückstände an den beobachteten Effekten. Insgesamt betrachtet bestätigen die in der Literatur beobachteten DNA-strangbrechenden Wirkungen der SWCNTs die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse, auch wenn sich ein Vergleich mit der bestehenden Datenlage aufgrund bereits genannter Gründe wie den Unterschieden in Zelllinie, CNT-Material und dem betrachteten Konzentrationsbereich schwierig gestaltet.

Um die im alkalischen Comet Assay detektierten DNA-Schäden weiter zu charakterisieren, wurde der Comet Assay zusätzlich unter neutralen Elektrophoresebedingungen durchgeführt. Laut Singh et al. [1988] erlaubt diese Modifikation des Comet Assays den ausschließlichen Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen, da DNA bei neutralem pH-Wert als Doppelstrang vorliegt und eine DNA-Migration während der Elektrophorese überwiegend in Regionen mit DNA-Doppelstrangbrüchen vorkommt. Die Ergebnisse einer 24-stündigen Inkubation von HT29-Zellen

mit SWCNTs zeigten über den gesamten Konzentrationsbereich gegenüber der Kontrolle keine Erhöhung der Schweifintensität (siehe Abb. 4.23), was zunächst darauf hindeutet, dass die DNA durch die untersuchten SWCNTs nicht vorherrschend in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen geschädigt wurde. Dieses Ergebnis widerspricht Studien von Cveticanin et al. [2009] oder Zhu et al. [2007], in welchen eine deutliche Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch CNTs (MWCNTs und SWCNTs) nachgewiesen werden konnte. Jedoch unterscheiden sich die in den genannten Studien untersuchten CNTs in ihrer Beschaffenheit deutlich (MWCNTs und SWCNTs) von den in dieser Arbeit untersuchten. Dennoch müssen angesichts der Ergebnisse der unter neutralen pH-Bedingungen durchgeführten Einzelzellelektrophorese in Zusammenhang mit der Methode des Comet Assays weitere Überlegungen hinsichtlich der bei alkalischem pH-Wert beobachteten Beeinflussung der DNA-Integrität angestellt werden.

So gehen aktuell die Auffassungen darüber, welche Art von DNA-Schäden mit dem Comet Assay unter neutralen Elektrophoresebedingungen erfasst werden, auseinander. Die meist verbreitete Auffassung zur Anwendbarkeit des Comet Assays entspricht der von Singh et al. [1988] aufgestellten Theorie, dass DNA-Einzelstrangbrüche unter neutralen pH-Bedingungen nicht mittels Comet Assay detektiert werden können. Nach Singh et al. [1988] entsteht ein Kometenschweif, wenn fragmentierte DNA einem elektrischen Feld ausgesetzt ist. Da DNA bei neutralem pH-Wert als Doppelhelix vorliegt, führen Doppelstrangbrüche zu DNA-Fragmenten, nicht jedoch zu DNA-Einzelstrangbrüchen. Demnach können Einzelstrangbrüche nur erfasst werden, wenn die DNA zuvor durch Anwendung eines alkalischen pH-Werts in Einzelstränge überführt wird. Dem gegenüber steht die Ansicht, dass mithilfe des Comet Assays unter neutralen pH-Bedingungen auch DNA-Einzelstrangbrüche detektiert werden [Collins et al., 1997; Collins, 2004; Collins et al., 2008; Shaposhnikov et al., 2008]. Als Erklärung für diese Behauptung wird die erstmals von Cook et al. [1976] beschriebene, während der Zelllyse entstehende, Struktur der DNA herangezogen. So werden nach Collins [2004] bei der Zelllyse unter Anwendung eines nicht-ionischen Detergens und hoher Salzkonzentration (bis 2,5 M NaCl) die meisten Histone aufgelöst und es bleiben Zellkern-ähnliche Strukturen, sog. Nukleoide, zurück, welche aus superspiralisierten DNA-Schleifen bestehen, die mit der Kernmatrix verbunden sind. Durch einen DNA-Strangbruch wird die Relaxation der betreffenden Schleife bewirkt, was ihr ermöglicht, während der Elektrophorese im elektrischen Feld in Richtung Anode zu migrieren, wobei nach Collins et al. [2008], unabhängig vom pH-Wert, bereits ein DNA-Einzelstrangbruch ausreichend ist. Diese auf Einzelstrangbrüchen basierende Relaxation der DNA-Schleifen würde dann auch unter neutralen Bedingungen als Kometenschweif sichtbar werden. Abbildung 4.32 zeigt die Entstehung superspiralisierter DNA-Schleifen und deren Verhalten im elektrischen Feld.

Gegen die Annahme, dass DNA-Einzelstrangbrüche auch unter neutralen Elektrophoresebedingungen erfasst werden können, sprechen die Beobachtungen von Wojewódzka et al. [2002]. Nach UV-C Bestrahlung, durch die bekannterweise DNA-Einzelstrangbrüche generiert werden, konnten Wojewódzka et al. [2002] lediglich unter alkalischen Bedingungen im Comet Assay eine DNA-Schädigung detektieren, während im neutralen Comet Assay keine DNA-schädigende Wirkung festgestellt wurde.

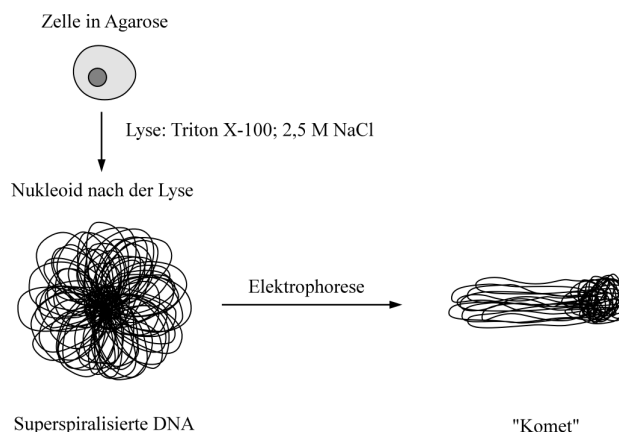


Abbildung 4.32: Hypothese zur Bildung des Kometenschweifes im Comet Assay unter neutralen pH-Bedingungen [Shaposhnikov et al., 2008].

Wird jedoch vorausgesetzt, dass DNA-Einzelstrangbrüche auch im neutralen Comet Assay sichtbar sind, bedürfen die Ergebnisse des unter alkalischen Bedingungen durchgeführten Comet Assays weiterer Erklärung. Eine mögliche Ursache der DNA-strangbrechenden Wirkung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs könnte eine Interaktion des Nanomaterials mit einsträngiger DNA („single stranded“, ssDNA) darstellen. ssDNA wird in der Literatur als effizientes Dispersionsmittel für SWCNT-Bündel beschrieben. Laut Zheng et al. [2003] kommt es bei paralleler Ausrichtung von aromatischen DNA-Basen an der CNT-Außenwand zur Überlappung der π -Orbitale. Als Folge davon windet sich der DNA-Einzelstrang helikal um die Kohlenstoffnanoröhre. Dieser Vorgang wird von Zheng et al. [2003] als sog. „ π -stacking“ bezeichnet (siehe Abb. 4.33). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bindungsenergie zwischen ssDNA und CNT ausreicht,

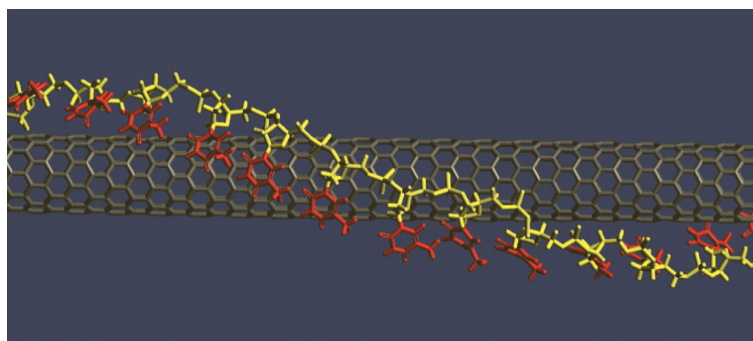


Abbildung 4.33: Bindungsmodell einer von einzelsträngiger DNA (ssDNA) umwundenen Kohlenstoffnanoröhre. DNA-Basen sind rot, das Ribose-Phosphat-Rückgrat gelb dargestellt [Zheng et al., 2003].

um mit derjenigen der CNTs untereinander zu konkurrieren [Zheng et al., 2003]. Eine derartige Interaktion zwischen ssDNA und den in dieser Arbeit untersuchten Nanoröhren ist durchaus vorstellbar, da internalisierte SWCNTs nach der Zellyse mit intakter DNA in Kontakt kommen können und zudem während der Elektrophorese bei alkalischem pH-Wert der DNA-Doppelstrang separiert wird. Die entstehende ssDNA könnte sich um anwesende SWCNTs herumwinden, wodurch es aufgrund von Torsionskräften zum Brechen des DNA-Rückgrates kommen könnte. Die

entstehenden Fragmente könnten dann im elektrischen Feld wandern und unter dem Fluoreszenzmikroskop als Kometen erscheinen. Die gemessenen Effekte des alkalischen Comet Assays wären damit in erster Linie eine Folge der Interaktion zwischen den SWCNTs und einzelsträngiger DNA und damit im Wesentlichen ein Artefakt des Testsystems.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die zur Untersuchung im Comet Assay isolierte DNA der SWCNT-behandelten HT29-Zellen mittels Raman-Spektroskopie auf Assoziation mit dem Nanomaterial untersucht. Hierzu wurden die für den Assay angefertigten Objektträger samt eingebetteter DNA mit monochromatischem Licht angeregt und Raman-Spektren aufgenommen. Jedoch konnten keine für SWCNTs charakteristischen Raman-Intensitäten festgestellt werden. Darauf folgende Raman-spektroskopische Untersuchungen eingebetteter SWCNTs bekannter Konzentrationen und relevanter Größenordnung (0,00001 - 0,2 µg/ml) haben gezeigt, dass die in den biologischen Untersuchungen getesteten Konzentrationen zu niedrig sind, um die Nachweisgrenze des eingesetzten Raman-Spektroskops zu erreichen. Damit konnte eine Interaktion von ssDNA und SWCNTs nicht experimentell nachgewiesen werden.

Um die Ergebnisse des unter alkalischen Bedingungen durchgeführten Comet Assays zu verifizieren, wurde der Einfluss von SWCNTs auf den Phosphorylierungsstatus des Tumorsuppressorproteins p53 sowie die Bildung von Mikrokernen untersucht. Sowohl die Bildung von Mikrokernen als auch eine durch CNTs bewirkte Erhöhung des Phosphorylierungsstatus von p53 sind in der Literatur bereits beschrieben [Kisin et al., 2007; Muller et al., 2008; Zhu et al., 2007]. p53 wird infolge von DNA-Schäden u.a. durch Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert, woraufhin es als „Wächter des Genoms“ Zielgene transaktiviert, die den Zellzyklusarrest initiieren, an der DNA-Reparatur teilnehmen oder gegebenenfalls die Apoptose einleiten [Helton und Chen, 2007; Offer et al., 1999; Zhou et al., 2001] (siehe Abschnitt 2.7.2). Nach 3-stündiger Exposition von HT29-Zellen gegenüber SWCNTs war eine deutliche Phosphorylierungszunahme im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Diese erreichte bei einer Konzentration von 0,005 µg/ml ($\hat{=}$ 1,2 ng/cm²) ihr Maximum (etwa 250 % gegenüber der Kontrolle) und verringerte sich anschließend wieder, was im Fall der 24 h Inkubation unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten etwa dem im alkalischen Comet Assay beobachteten Effektverlauf entspricht. Mit zunehmender Inkubationszeit stieg die Phosphorylierungsrate geringfügig weiter an (siehe Abb. 4.26 und 4.27). Die Einleitung der Apoptose nach 24-stündiger Exposition der Zellen gegenüber SWCNTs als Folge der Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 kann aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen zur Induktion apoptotischer Prozesse für den betrachteten Zeitraum ausgeschlossen werden (siehe Abb. 4.28). Weitere Folgen einer p53-Aktivierung, wie bspw. das Einleiten eines Zellzyklusarrests oder das Anschalten spezifischer DNA-Reparaturmechanismen, (siehe Abschnitt 2.7.2), müssen in diesem Kontext durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse kann jedoch von einer DNA-schädigenden Wirkung der untersuchten SWCNTs ausgegangen werden. Diese nimmt mit zunehmender Expositionsdauer zu. Dieser zeitabhängige Anstieg der beobachteten Effekte wäre mit einer erhöhten zellulären Aufnahme der SWCNTs mit zunehmender Inkubationszeit zu erklären. Die Abnahme der DNA-strangbrechenden Wirkung im alkalischen Comet Assay sowie der Phosphorylierung von p53 in

höheren SWCNT-Konzentrationen könnte durch eine auf starken van der Waals Kräften basierenden Bündelung der hydrophoben Nanoröhren bedingt sein, durch welche deren spezifische Oberfläche und damit Reaktivität vermindert wird. Resultierend aus diesem Agglomerationsverhalten wäre auch eine im Vergleich zu monodispersierten Röhren erniedrigte Internalisierungsrate der SWCNTs in diesen Konzentrationen denkbar.

Auffällig ist, dass der Anstieg der beobachteten Effekte über die Untersuchungszeiträume von 3 und 24 h im Comet Assay im Vergleich zum Anstieg der Phosphorylierung von p53 unverhältnismäßig höher lag. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse des alkalischen Comet Assays durch die oben beschriebene Interaktion zwischen ssDNA und SWCNTs beeinflusst wurden.

Die DNA-schädigende Wirkung von SWCNTs wird jedoch zusätzlich durch die Untersuchung zur Induktion von Mikrokernen durch SWCNTs in V79-Zellen bestätigt. Nach 24-stündiger Expositionsdauer war ein leichter jedoch signifikanter Anstieg kinetochor-negativer Mikrokerne in subzytotoxischen Konzentrationen festzustellen (siehe Abb. 4.31). Vergleichbar mit den Ergebnissen des alkalischen Comet Assays sowie der Phosphorylierung von p53 waren die stärksten Effekte in einem Konzentrationsbereich von 0,005 - 0,05 µg/ml ($\hat{=}$ 1,2 - 11,7 ng/cm²) zu sehen. Die im weiteren Konzentrationsverlauf zu beobachtende Abnahme der Mikrokernanzahl könnte durch eine, wie bereits erwähnt, möglicherweise auftretende Agglomeration der Kohlenstoffnanoröhren zu erklären sein. Der im Vergleich zur im Comet Assay festgestellten DNA-schädigenden Wirkung weniger stark ausgeprägte Effekt im MN-Test könnte einerseits durch die beschriebene Interaktion von ssDNA und SWCNTs bedingt sein, andererseits werden im MN-Test lediglich Schäden des Genoms detektiert, welche mind. einen Zellzyklus lang verbleiben. Der Comet Assay erfasst dagegen auch DNA-Schäden, die repariert werden können [van Goethem et al., 1997; Kisin et al., 2007].

Insgesamt betrachtet, zeigten SWCNTs eine DNA-schädigende Wirkung, welche bereits in subzytotoxischen Konzentrationen auftrat und mit zunehmender Expositionsdauer anstieg. Darüber hinaus führten die untersuchten SWCNTs zur Bildung kinetochor-negativer Mikrokerne, was auf eine klastogene Wirkung dieser Nanostruktur hindeutet. Eine unter den pH-Bedingungen des alkalischen Comet Assays möglicherweise auftretende Interaktion zwischen ssDNA und SWCNTs kann nicht ausgeschlossen werden. Auch hinsichtlich der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen sind weitere Untersuchungen notwendig. In Anbetracht der Ergebnisse kann jedoch von einer genotoxischen Wirkung durch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs ausgegangen werden.

Hinsichtlich des genotoxischen Wirkmechanismus der untersuchten SWCNTs kann eine ROS-vermittelte DNA-Schädigung weitestgehend ausgeschlossen werden. Denn auch wenn die Ergebnisse zur Modulation des zellulären Redoxstatus durch SWCNTs zu keiner eindeutigen Aussage führen, erlauben weitere Indizien diese Schlussfolgerung zu ziehen: Zum Einen wurden im Comet Assay unter alkalischen Bedingungen nach Behandlung mit dem DNA-Reparaturenzym FPG keine FPG-sensitiven Stellen detektiert. Zum Anderen setzte die DNA-strangbrechende Wirkung bereits in SWCNT-Konzentrationen ein, in denen im DCF-Assay keine Fluoreszenzzunahme für

SWCNT-behandelte Proben im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten war. Damit scheint auch ein Beitrag der metallischen Rückstände Ni und Co zum DNA-schädigenden Potential der SWCNTs unwahrscheinlich, da diese Ihre Wirkung vornehmlich über die Generierung von ROS entfalten [Colognato et al., 2008; Oller et al., 1997]. Darüber hinaus sind von Co und Ni ausgehende genotoxische Effekte in der Literatur in weitaus höheren Konzentrationen, als sie für die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs ermittelt wurden ($\leq 0,13 \mu\text{M}$ bzw. $\leq 3,8 \text{ wt.}\%$), beschrieben. Colognato et al. [2008] haben bspw. in Untersuchungen zum genotoxischen Potential von Co-NP eine DNA-strangbrechende Wirkung und Bildung von Mikrokernen in Konzentrationen $> 40 \mu\text{M}$ festgestellt. Zur genotoxischen Wirkung von Ni-NP existieren sehr wenige Studien. Lediglich durch Zhang et al. [1998; 2003] und Ispas et al. [2009] wurde, allerdings in *in vivo* Untersuchungen, eine biologische Wirksamkeit dieses Metalls in nanostrukturierter Form in Konzentrationen $> 800 \mu\text{M}$ beobachtet. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die Metallrückstände fest in die Nanoröhrenmatrix eingebunden sind. Ihre Freisetzung würde demnach eine Zerstörung der Struktur des Nanomaterials erfordern. Wenngleich eine Zellgängigkeit von in SWCNTs enthaltenem Ni-NP in *in vitro* Untersuchungen bereits nachgewiesen werden konnte, kann ausgehend vom absoluten Gehalt an Metallrückständen nicht abgeschätzt werden, wieviel Metall anteilig freigesetzt wird. Untersuchungen von Liu et al. [2007] haben für Ni eine Freisetzungsrate von 2 - 9 % ermittelt. Jedoch ist dies in Abhängigkeit vom Reinheitsgrad des Untersuchungsmaterials sowie den Versuchsbedingungen zu betrachten, so dass keine allgemein zutreffenden Aussagen getroffen werden können. Insgesamt waren die Gehalte der metallischen Rückstände der in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs jedoch so gering ($\leq 0,13 \mu\text{M}$), dass selbst bei deren vollständiger Freisetzung nicht die in der Literatur mit biologischen Effekten verbundenen Konzentrationen hätten erreicht werden können.

Neben einer ROS-vermittelten Schädigung der DNA, wie sie vielfach für Nanomaterialien in der Literatur beschrieben ist [Don Porto Carero et al., 2001; Dybdahl et al., 2004; Gurr et al., 2005; Unfried et al., 2007], können Nanomaterialien jedoch auch direkt mit der DNA wechselwirken. Dies könnte die in der vorliegenden Arbeit festgestellten DNA-schädigenden Eigenschaften der untersuchten SWCNTs erklären. Eine direkte Wechselwirkung nanostrukturierter Materie mit der DNA erfordert jedoch u.a. deren Transport in den Zellkern (siehe Abschnitt 2.5.4.3). Daneben ist eine direkte Interaktion zwischen dem Nanomaterial und der DNA während der Mitose nach Auflösung der Kernmembran denkbar. Eine nukleäre Translokation von SWCNTs konnte erstmals durch Porter et al. [2007] mittels Konfokalmikroskopie in Humanmakrophagen nachgewiesen werden. Die untersuchten SWCNTs besaßen einen mittleren Durchmesser von 0,9 - 1,2 nm und lagen damit unter dem Durchmesser einer Kernpore von etwa 9 nm. Auch die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs waren mit einem mittleren Durchmesser von 1,7 nm weitaus kleiner, sodass ebenfalls von einer Translokation in den Zellkern ausgegangen werden kann. Der Aufnahmemechanismus ist noch weitestgehend unaufgeklärt. Beispielsweise stellt sich die Frage, ob Nanostrukturen eines Durchmessers $< 10 \text{ nm}$ für ihre Aufnahme in den Zellkern aktiver Aufnahmemechanismen bedürfen oder durch Diffusion in dieses Zellkompartiment gelangen [Unfried et al., 2007]. Von einer direkten Wechselwirkung von CNTs mit der DNA gehen auch Muller et al.

[2008] aus, die in ihrer Studie keine Generierung von ROS durch das Untersuchungsmaterial trotz dessen Verunreinigung mit etwa 1 wt.% Co jedoch sowohl klastogene (Chromosomenfragmentierung) als auch aneugene (Verlust ganzer Chromosomen) Wirkung in MCF7-Zellen (humane Mammakarzinomzelllinie) feststellen konnten. Bei dem Untersuchungsmaterial handelte es sich allerdings um MWCNTs eines Durchmessers von 11,3 nm und einer Länge von 0,7 μm , so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht mit denen von Muller et al. [2008] vergleichbar sind. Die Autoren gehen im Fall der aneugen Wirkung der MWCNTs von einer Beeinflussung des Spindelapparats durch das Untersuchungsmaterial während der Zellteilung aus. Ein derartiger Wirkmechanismus kann für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SWCNTs weitestgehend ausgeschlossen werden, da im MN-Test überwiegend die Bildung kinetochor-negativer Mikrokerne festgestellt wurde. In Zusammenhang mit einer den Spindelapparat bzw. das Tubulingerüst beeinflussenden Wirkung und einer daraus resultierenden Chromosomenfehlverteilung während der Mitose werden jedoch vornehmlich kinetochor-positive Mikrokerne gebildet.

Zur weiteren Aufklärung des genotoxischen Wirkmechanismus der in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs sind weiterführende Untersuchungen erforderlich. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die Überprüfung einer gegebenenfalls auftretenden Interaktion des Nanomaterials mit nukleären Substrukturen, wie z.B. DNA-Reparaturenzymen, Histonen oder Topoisomerasen [Unfried et al., 2007].

4.1.6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Frage nachgegangen werden, ob einwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWCNT) in der Lage sind in Zellen des Gastrointestinaltrakts einzudringen und eine Zellantwort auszulösen. Die Untersuchungen hierzu wurden exemplarisch an der gut charakterisierten humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt. Dabei standen im Fokus dieser Arbeit mögliche zytotoxische bzw. das Zellwachstum beeinflussende Wirkungen, die Modulation des zellulären Redoxstatus und die daraus resultierenden Konsequenzen für abhängige zelluläre Signalwege sowie die Aufrechterhaltung der DNA-Integrität. Vorab wurde eine eingehende Charakterisierung des Untersuchungsmaterials vorgenommen.

Die untersuchten SWCNTs wurden mit dem Verfahren der Laserablation synthetisiert und durch Gradientenzentrifugation von metallischen Katalysatoren befreit. Dadurch konnte der Metallgehalt an Kobalt und Nickel auf $\leq 3,8$ wt.% reduziert werden. Für die biologischen Untersuchungen wurden die SWCNTs in Natriumcholat (NaC) suspendiert, um vornehmlich die zellulären Wirkungen monodisperser Nanoröhren zu erfassen. Mittels Raman-Spektroskopie konnte das Vorhandensein vorwiegend einzeln vorliegender SWCNTs bestätigt und durch Rasterkraftmikroskopie ein mittlerer Durchmesser von 1,8 nm sowie eine mittlere Länge von 530 nm bestimmt werden. Um vom Dispersionsmittel ausgehende artifizielle Ergebnisse auszuschließen, wurde NaC (0,02 %) als Kontrolle in allen Versuchsdurchführungen mitgeführt. Dabei war keine Beeinflussung der biologischen Endpunkte durch dieses Agens in der eingesetzten Konzentration festzustellen.

Die zelluläre Aufnahme der vorliegenden SWCNTs in HT29-Zellen konnte aufgrund deren Ähn-

lichkeit mit zellulären Strukturen hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung und Größenordnung nicht direkt nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zum Zellwachstum ergaben, dass eine Wachstumshemmung nur nach längerer Exposition (48 h und 72 h) und in höheren Konzentrationen ($0,05 - 0,2 \mu\text{g/ml} \hat{=} 11,7 - 46,7 \text{ ng/cm}^2$) auftritt. Obwohl die SWCNTs in diesem Konzentrationsbereich ($0,05 - 0,2 \mu\text{g/ml}$) nach 24-stündiger Exposition das Wachstum der HT29-Zellen nicht hemmten, war bereits ab einer Konzentration von $0,05 \mu\text{g/ml}$ eine verminderte Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen festzustellen. Diese betrug in der höchsten getesteten Konzentration nur noch $(72 \pm 9) \%$. Die Integrität der Zellmembran wurde nach 24-stündiger Exposition indes nicht beeinflusst. Insgesamt zeigte sich somit, dass die untersuchten SWCNTs nach 24-stündiger Exposition die Aktivität der Mitochondrien einschränken, was jedoch keine Auswirkung auf die Viabilität der Zellen hat. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Untersuchungen zur Apoptose-Induktion.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Modulation des zellulären Redoxstatus durch SWCNTs wurde in Konzentrationen von $0,05 - 0,2 \mu\text{g/ml}$ bereits nach 1-stündiger Inkubation eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Fluoreszenzintensität im DCF-Assay festgestellt, was auf eine Modulation des zellulären Redoxstatus hindeutet. Diese korrelierte invers mit der Expositionsdauer, so dass das Fluoreszenzsignal nach einer Inkubationszeit von 3 h in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration um bis zu 50 % vermindert war. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte nach 1-stündiger Inkubation im gleichen Konzentrationsbereich eine leichte Erhöhung des Transkriptionsfaktors Nrf2 im Zellkern beobachtet werden, welche sich mit zunehmender Expositionsdauer analog zu den Ergebnissen im DCF-Assay verringerte. Die nukleäre Erhöhung des Nrf2-Proteins spiegelte sich in einer leichten Zunahme des zellulären tGSH-Gehalts nach 3-stündiger Inkubation wider. Mit zunehmender Expositionsdauer war indes eine geringe Abnahme des zellulären tGSH-Gehalts festzustellen. Dies könnte auf den nach einer 24-stündigen Exposition beobachteten Funktionsverlust der Mitochondrien und eine daraus resultierende Erhöhung des zellulären ROS-Gehalts zurückzuführen sein. Im Falle eines ROS-vermittelten Mechanismus würde der zelluläre Gesamt-GSH-Gehalt (Summe aus GSH und GSSG) jedoch konstant bleiben, da GSH zu GSSG oxidiert würde. Hierbei wäre die Abnahme des GSH-Gehalts vergleichbar mit der Zunahme des GSSG-Gehalts. Ein Absinken des tGSH-Gehalts deutet somit vielmehr auf einen GSH-Verlust aus dem zellulären „GSH/GSSG-Haushalt“ hin. Hinsichtlich der Depletion des tGSH-Spiegels sind somit weitere Untersuchungen erforderlich.

Die beschriebenen Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs in HT29-Zellen innerhalb von 1 h zu einer Modulation des zellulären Redoxstatus führen. Ein Beitrag der in den SWCNTs enthaltenen Metallrückstände zu den beobachteten Wirkungen ist unter Beachtung der bestehenden Literatur durchaus denkbar. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die untersuchten SWCNTs aufgrund ihrer geringen Größe und der daraus resultierenden großen spezifischen Oberfläche eine erhöhte Reaktivität besitzen und somit die Redox-Homöostase beeinflussen. Jedoch war in dem durchgeführten DCF-Assay ein im Vergleich zur nukleären Nrf2-Translokation und Beeinflussung des tGSH-Gehalts unverhältnismäßig starker Effekt zu beobachten. Während sich die Fluoreszenzintensität nach 1-stündiger Inku-

bation gegenüber der Kontrolle um mehr als das Sechsfache erhöhte, waren die Ergebnisse der Nrf2-Translokation sowie der Modulation des tGSH-Gehalts nur schwach ausgeprägt. Darüber hinaus kann aus Untersuchungen im zellfreien System nicht eindeutig geschlussfolgert werden, ob die untersuchten SWCNTs bereits zellfrei unter Mitwirkung von Luftsauerstoff zur Bildung von ROS beitrugen oder vielmehr mit dem im DCF-Assay eingesetzten Untersuchungsmaterial interagierten und daher artifizielle Ergebnisse generiert wurden. So zeigten die Ergebnisse des zellfrei durchgeführten DCF-Assays einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, der sich nach Zugabe des H_2O_2 -abbauenden Enzyms Katalase verminderte. Jene Beobachtung konnte auch im zellulären Testsystem gemacht werden und deutet auf die Bildung von H_2O_2 durch SWCNTs hin. Jedoch konnte in Untersuchungen zur Entstehung von H_2O_2 durch SWCNTs keine Bildung dieser reaktiven Sauerstoffspezies festgestellt werden. Ein Grund für die beschriebenen Beobachtungen könnte eine Interaktion zwischen den SWCNTs, dem DCF-Farbstoff und der Katalase oder auch mit Bestandteilen des Zellkulturmediums sein, was zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Dennoch ist aufgrund der Beeinflussung des tGSH- und Nrf2-Gehalts eine den zellulären Redoxstatus beeinflussende Wirkung der SWCNTs denkbar.

Ferner wurde bereits in subzytotoxischen Konzentrationen eine DNA-strangbrechende Wirkung der SWCNTs in HT29-Zellen festgestellt, welche sich mit ansteigender Inkubationszeit erhöhte. Diese Beobachtung konnte durch eine mit der Expositionsdauer zunehmende Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 bestätigt werden. Dabei scheint die DNA-schädigende Wirkung nicht auf einen oxidativen Mechanismus zurückzuführen zu sein, was Untersuchungen mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) ergaben. Auch eine infolge einer Apoptose-Induktion hervorgerufene DNA-Schädigung ist nicht anzunehmen. Jedoch kann auch in diesem Kontext ein die biologischen Ergebnisse beeinflussendes physikochemisches Verhalten der SWCNTs nicht ausgeschlossen werden. Anlass dieser Überlegung ist die Tatsache, dass SWCNTs eine hohe Affinität gegenüber einzelsträngiger DNA aufweisen, was möglicherweise Einfluss auf die im alkalischen Comet Assay beobachteten Effekte hatte. Jedoch konnte eine durch SWCNTs vermittelte Bildung von Mikrokernen, bestehend aus Chromosomenfragmenten, in V79-Zellen gezeigt werden, was das genotoxische Potential dieses Nanomaterials zusätzlich untermauert.

Insgesamt betrachtet weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine negative Beeinflussung humaner Kolonkarzinomzellen (HT29) durch einwandige Kohlenstoffnanoröhren hin. Im Vordergrund steht dabei der zelluläre Redoxstatus sowie die Integrität der DNA. Über die zugrunde liegenden Mechanismen kann bislang keine gesicherte Aussage getroffen werden, was unter anderem mit der Vielfalt der Einflussmöglichkeiten zusammenhängt: Die biologische Wirkung von SWCNTs kann sowohl von Durchmesser, Länge, Oberflächenbeschaffenheit und Verunreinigungsgrad als auch von den Versuchsbedingungen, wie z. B. der Wahl der Zelllinie und der Präparation der Testsubstanzen, abhängen. Zudem besteht die Möglichkeit einer Interaktion dieses Nanomaterials mit Untersuchungsmaterialien.

4.2 Nanostrukturiertes Platin (Pt)

Im Zusammenhang mit der Erfassung der toxikologischen Relevanz von nanopartikulärem Pt wurde besonderes Augenmerk auf eine mögliche Korrelation zwischen Partikeldurchmesser und den auftretenden biologischen Wirkungen gelegt. Hierzu wurden verschiedene Pt-Präparationen hergestellt und hinsichtlich Durchmesser- und Agglomerationsverteilung sowie Agglomerationsgrad mittels elektronenmikroskopischer Methoden eingehend charakterisiert. Zur Erfassung der toxikologisch relevanten Endpunkte wurden im Wesentlichen die gleichen Testsysteme verwendet, wie sie für die SW-CNTs in Abschnitt 4.1 im Rahmen der Ergebnisse bereits erläutert wurden. Daher wird in diesem Abschnitt lediglich auf etwaige Abweichungen hingewiesen. Des Weiteren wurde mittels Elektronenmikroskopie die zelluläre Aufnahme der Pt-NP untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit abgebildeten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Mitarbeitern von Prof. D. Gertsen im Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Fakultät für Physik am KIT erstellt.

In Abschnitt 4.2.1 werden zunächst die Charakteristika der in dieser Arbeit eingesetzten Pt-Präparationen vorgestellt. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen beschrieben und im Hinblick auf einen möglichen Wirkmechanismus unter Berücksichtigung des aktuellen Forschungsstands diskutiert.

4.2.1 Charakterisierung der untersuchten Pt-Partikel

Die in dieser Arbeit untersuchten Pt-NP wurden in einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen des KIT („Nano-Cell“-Projekt) hergestellt (siehe Abschnitt 2.9.2). Die Partikelsynthese erfolgte ausgehend von dem Vorläuferkomplex $\text{PtMe}_2(\text{COD})$, der mittels SFRD-Verfahren durch Variation der Versuchsbedingungen zu Pt-NP unterschiedlicher Durchmesser reduziert wurde. Der Herstellungsprozess wie auch die entsprechenden Versuchsbedingungen sind Abschnitt 2.9.2 zu entnehmen. Folgende Pt-Präparationen wurden mittels SFRD-Verfahren synthetisiert:

- Pt-CD0,
- Pt-CD2 und
- Pt-CD3.

CD steht für das Trägermaterial β -Cyclodextrin, auf dem die Pt-Partikel abgeschieden wurden (siehe Abschnitt 2.9.2 Abb. 2.25). Die Kennzahlen 0, 2 und 3 wurden zur Bezeichnung der hinsichtlich Durchmesser- und Agglomerationsverteilung, Form und Kristallinität verschiedenen Pt-Präparationen eingeführt. Diese Eigenschaften wurden im Anschluss an die Herstellung der einzelnen Präparationen mittels elektronenmikroskopischer Methoden erfasst. Des Weiteren wurde das Agglomerationsverhalten der Pt-Partikel im Zellkulturmedium anhand der Pt-Präparation Pt-CD2 untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend beschrieben.

4.2.1.1 Charakterisierung der Partikelgrößenverteilung der eingesetzten Pt-Präparationen

Pt-Partikel der Präparation Pt-CD0 Die Abbildungen 4.34 a und b zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pt-Partikeln der Präparation Pt-CD0. In Abbildung 4.34 a ist eine transmissionselektronenmikroskopische Hellfeldaufnahme („TEM bright field“) der Pt-Partikel zu sehen. Dabei sind neben einzeln vorliegenden Pt-Partikeln vorwiegend Partikelagglomerate eines Durchmessers von etwa 100 nm zu erkennen. Abbildung 4.34 b zeigt eine hochauflösende TEM-Aufnahme („high resolution TEM“, HRTEM) eines etwa 30 nm großen Pt-Agglomerats, das aus Pt-Kristalliten eines Durchmessers von weniger als 5 nm besteht. Diese Pt-Kristallite scheinen die strukturellen Grundbausteine der agglomerierten Partikels zu sein. Durch die enge Verbindung der Grundbausteine wird angenommen, dass es sich bei dem Agglomerat nicht um ein während der Vorbereitung der Probe für die TEM-Aufnahme entstandenes Artefakt handelt. Darüber hinaus sind in näherer Umgebung zum Agglomerat sehr kleine Pt-NP (ca. 2 - 3 nm) zu erkennen.

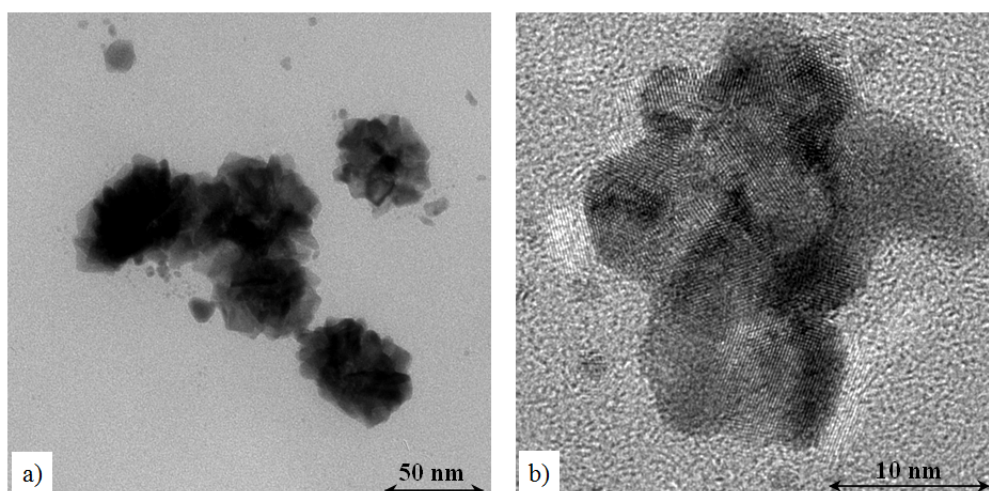


Abbildung 4.34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pt-Partikeln der Präparation Pt-CD0. a) TEM-Aufnahme; b) HRTEM-Aufnahme eines Partikelagglomerats bestehend aus Nanokristalliten eines Durchmessers von etwa 5 nm (erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT) [Pelka et al., 2009].

Pt-Partikel der Präparation Pt-CD2 Die Abbildungen 4.35 a und b zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pt-Partikeln der Präparation Pt-CD2. Wie aus Abb. 4.35 a hervorgeht, liegen die Pt-NP dieser Präparation leicht agglomeriert vor, jedoch sind die Agglomerate mit Durchmessern von etwa 30 nm deutlich kleiner als die der vorherig beschriebenen Präparation. Zudem sind die Pt-NP der Präparation Pt-CD2 im Vergleich zu Pt-CD0 mit einer typischen Größe von ≤ 10 nm monodisperser und weisen eine rundere Form auf (siehe Abb. 4.35 b).

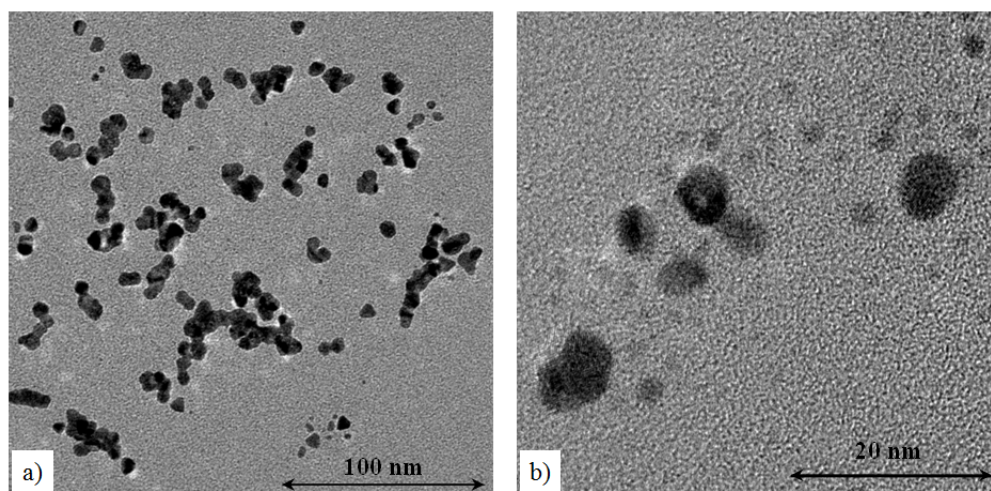


Abbildung 4.35: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pt-Partikeln der Präparation Pt-CD2. a) TEM-Aufnahme; b) HRTEM-Aufnahme von Pt-Partikeln mit Durchmessern < 10 nm (erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT) [Pelka et al., 2009].

Pt-Partikel der Präparation Pt-CD3 Die Abbildungen 4.36 a und b zeigen rasterelektronenmikroskopische („scanning electron microscopy“, SEM)-Aufnahmen von Pt-Partikeln der Präparation Pt-CD3. Aus den Aufnahmen wird deutlich, dass sich diese Präparation hinsichtlich des Durchmessers und des Agglomerationsgrads der Pt-Partikel signifikant von den vorhergehenden Präparationen unterscheidet. Die Aufnahme in Abb. 4.36 a lässt eine Agglomeration

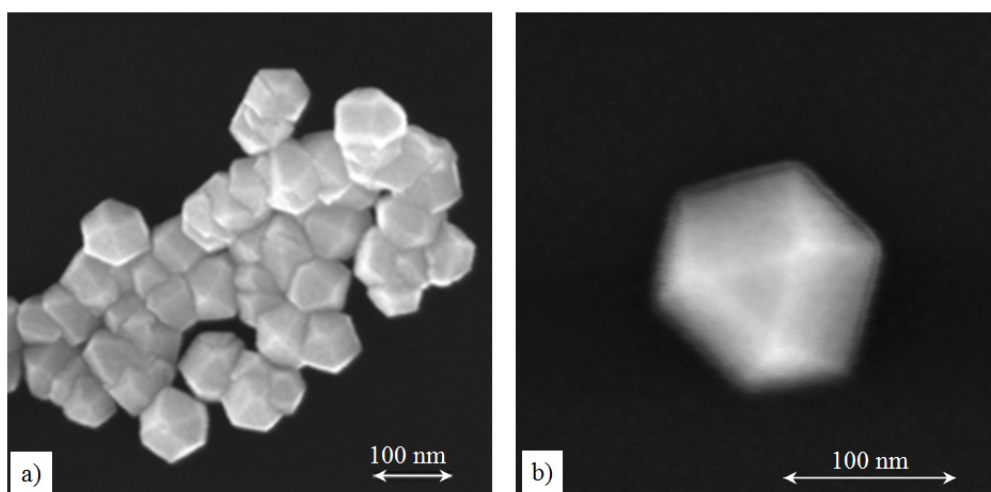


Abbildung 4.36: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pt-Partikeln der Präparation Pt-CD3. a) SEM-Aufnahme agglomerierter Pt-Partikel; b) SEM-Aufnahme eines einzelnen Pt-Partikels (erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT) [Pelka et al., 2009].

einzelner Pt-Partikel zu Verbänden von über 500 nm Größe erkennen. Abermals sind die Partikel verwachsen und scheinen nicht während der Vorbereitung der Probe für die TEM-Aufnahmen agglomeriert zu sein. Die Präparation Pt-CD3 besteht vorwiegend aus derartigen Agglomeraten. Daneben konnten vereinzelt auch Pt-NP und Pt-Partikel mit einem Durchmesser von etwas

mehr als 150 nm gefunden werden (siehe Abb. 4.36 b). Damit besitzen die Pt-Partikel der Präparation Pt-CD3 auch im vereinzelt vorliegendem Zustand einen im Vergleich zu den anderen Pt-Präparationen deutlich größeren Partikeldurchmesser. Des Weiteren weisen die Pt-Partikel dieser Präparation merklich ausgebildete kristallografische Facetten auf, was aus Abb. 4.36 b anhand der kuboktaedrischen Form des abgebildeten Pt-Partikels ersichtlich wird. Eine allgemeine Beschreibung von Clusterstrukturen und Formen für kubisch-flächenzentrierte Metalle wie Pt sowie entsprechende TEM-Analysen sind in Urban [1998] und Floresa et al. [2003] zu finden.

Die vorangegangenen Feststellungen bezüglich der Größe und des Agglomerationsgrads der Pt-Partikel der einzelnen Präparationen spiegeln sich in den zugehörigen Partikelgrößenverteilungen („particle size distribution“, PSD) wider. Die mittlere Partikelgröße und die PSD (im Weiteren dargestellt als d_{10} , d_{50} und d_{90}) wurden durch Bildanalyse (ImageV Version 1.38) von TEM- und SEM-Aufnahmen statistisch bestimmt. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der Bildanalysen bezüglich der Pt-NP-Größenverteilungen der Präparationen Pt-CD0, Pt-CD2 und Pt-CD3 zusammengefasst. Der d_{50} -Wert ist definiert als der Durchmesser, der die Menge aller Partikel

Tabelle 4.2: Partikeldurchmesserverteilung („particle size distribution“, PSD).

Experiment	$d_{10}(\text{nm})$	$d_{50}(\text{nm})$	$d_{90}(\text{nm})$	Δ
Pt-CD0	5,9	20,6	66,3	2,9
Pt-CD2	4,7	7,7	12,2	1,0
Pt-CD3	88,4	155	210	0,8

halbiert, in die Hälfte der Partikel mit einem größeren und die Hälfte der Partikel mit einem kleineren Durchmesser als der d_{50} -Durchmesser. Analog hierzu ist der d_{10} (d_{90})-Durchmesser definiert als der Durchmesser bei dem 10 % (90 %) aller Partikel einen kleineren Durchmesser und damit 90 % (10 %) einen größeren Durchmesser als den d_{10} (d_{90})-Durchmesser haben. In jede PSD-Berechnung wurden jeweils etwa 600 Partikeldurchmesser einbezogen. Dabei wurde Δ definiert als:

$$\Delta = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

und beschreibt somit die Polydispersität. Offensichtlich beinhaltet Präparation Pt-CD2 mit einem $d_{50} = 7,7$ nm und einer sehr engen Größenverteilung, ausgedrückt durch ein $\Delta = 1$, die kleinsten NP. Für die Pt-Partikel der Präparation Pt-CD0 wurde mit einem $\Delta = 2,9$ eine sehr breite Größenverteilung festgestellt. Die Partikelgröße deckt einen Bereich von etwa 6 - 66 nm ab. Im Fall der Präparation Pt-CD3 ist die relative Variation der Partikelgröße eher klein ($\Delta = 0,8$), aber der absolute Größenbereich mit 88 - 210 nm extrem groß. In Abb. 4.37 sind die aus den Bildanalysen ermittelten Werte der einzelnen Pt-Präparationen zur Veranschaulichung als Summenverteilung Q_1 (normiert auf 1) gegen den Partikeldurchmesser aufgetragen.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Bildanalysen werden die drei verschiedenen Pt-Präparationen

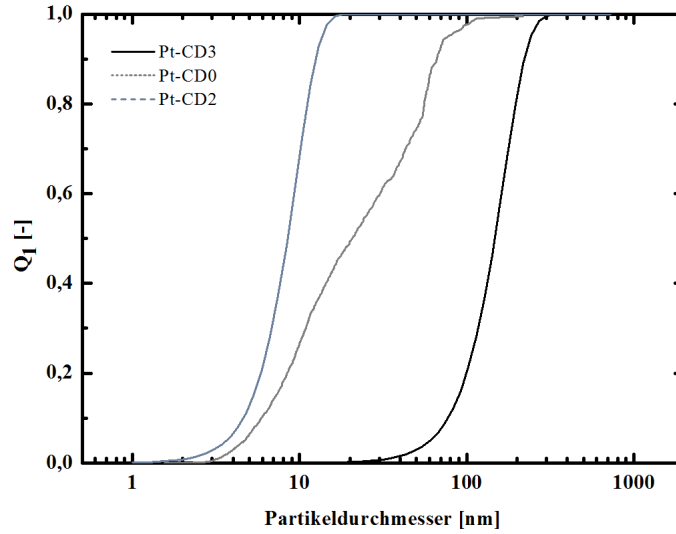


Abbildung 4.37: Einfluss der Versuchsbedingungen auf den Partikeldurchmesser im SFRD-Verfahren (erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Thermodynamik und Kältetechnik, KIT) [Pelka et al., 2009].

im Folgenden anhand der ermittelten Partikelgröße mit den Bezeichnungen $Pt < 100$ nm (für Pt-CD0), $Pt < 20$ nm (Pt-CD2), und $Pt > 100$ nm (Pt-CD3) unterschieden.

4.2.1.2 Charakterisierung des Agglomerationsverhaltens von Pt-Partikeln im Zellkulturmedium

Das Agglomerationsverhalten von Pt-Partikeln im serumhaltigen Zellkulturmedium wurde mittels SEM anhand der Pt-Präparation Pt-CD2 ($Pt < 20$ nm) untersucht. Prinzipiell ist eine elektronenmikroskopische Charakterisierung von Pt-Partikeln in einer derartigen Matrix aufgrund der Anwesenheit einer Vielzahl von Mediumbestandteilen wie Proteinen oder Salzen problematisch. Dies wird anhand von Abb. 4.38 a verdeutlicht. Abbildung 4.38 a zeigt eine mittels sog.

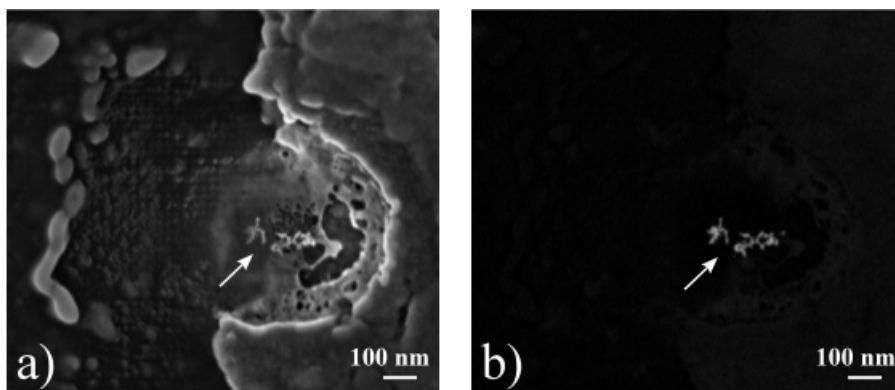


Abbildung 4.38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Zellkulturmediums nach Inkubation mit $Pt < 20$ nm (Pt-CD2, $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). a) SE-SEM-Aufnahme b) BSE-SEM-Aufnahme (Pt-Partikel sind mit Pfeilen gekennzeichnet). Erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT [Pelka et al., 2009].

Sekundärelektronen (SE) erstellte elektronenmikroskopische Aufnahme nach Dispersion von Pt-Partikeln < 20 nm einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in einer serumhaltigen wässrigen Lösung. Aufgrund des unzureichenden Kontrasts der SE-Detektion, ist eine Unterscheidung der verschiedenen im Medium enthaltenen Komponenten nicht möglich. Werden die Aufnahmen indes mittels sog. Rückstreuelektronen („backscattered electron“, BSE) erstellt, wird ein hoher Kontrast zwischen organischen und anorganischen Bestandteilen erreicht [Fleger et al., 1995], wodurch Elemente einer hohen Ordnungszahl wie Pt leicht identifiziert werden können (siehe Abb. 4.38 b). Anhand des Maßstabs kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Pt-Partikel eines Durchmessers < 100 nm handelt. Jedoch kann aufgrund der begrenzten lateralen Auflösung nicht gesagt werden, ob auf der Aufnahme einzeln vorliegende oder agglomerierte bzw. aggregierte Pt-Partikel zu sehen sind. Da bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nur einige wenige Pt-Partikel in der Probe gefunden wurden, wurde die Pt-Konzentration für weitere Untersuchungen auf $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erhöht. Erwartungsgemäß konnte eine größere Anzahl von Pt-Partikeln detektiert werden. Zudem konnte, wie aus Abb. 4.39 a ersichtlich wird, die Anwesenheit einzeln vorliegender Pt-NP nachgewiesen werden. Die Aufnahme a wurde 1 h nach Inkubation des

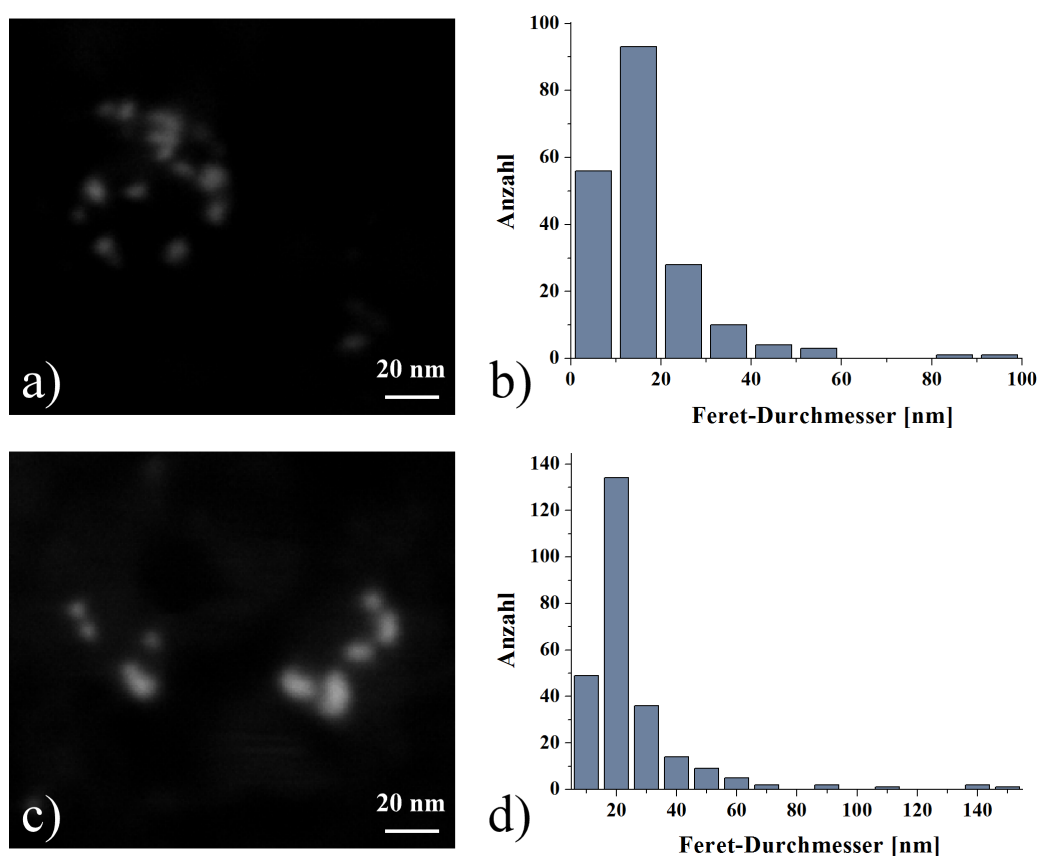


Abbildung 4.39: BSE-SEM-Aufnahme von Pt-Partikeln (Pt-CD2) im Zellkulturmedium nach 1-stündiger Inkubation (a) mit zugehöriger PSD (b), BSE-SEM-Aufnahme von Pt-Partikeln (Pt-CD2) im Zellkulturmedium nach 24-stündiger Inkubation (c) mit zugehöriger PSD (d). Erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT [Pelka et al., 2009].

Zellkulturmediums mit Pt-CD2 erstellt. Mittels der in Abschnitt 4.2.1.1 erwähnten Bildanaly-

se wurde die Größe von 196 einzelnen Partikeln bestimmt. Als Auswerteparameter wurde der sog. Feret-Durchmesser¹ herangezogen. Die daraus resultierende Partikelgrößenverteilung ist in Abb. 4.39 b dargestellt, wobei eindeutig zu erkennen ist, dass etwa 89 % der Pt-Partikel einen Durchmesser < 20 nm aufweisen. Des Weiteren ist, wie in Abb. 4.39 c gezeigt, mit zunehmender Inkubationszeit (24 h) eine geringe Agglomeration der Pt-Partikel zu beobachten, was sich in der zugehörigen Partikelgrößenverteilung widerspiegelt (siehe Abb. 4.39 d). Diese wurde aus der Bildanalyse von 255 Partikeln gewonnen.

4.2.2 Zelluläre Aufnahme von Pt-Partikeln

Die zelluläre Aufnahme von Pt-Partikeln wurde mittels elektronenmikroskopischer Methoden exemplarisch anhand der Pt-Präparation Pt-CD2 ($\text{Pt} < 20$ nm) untersucht. Hierzu wurden HT29-Zellen gemäß der in Abschnitt 5.8 beschriebenen Vorgehensweise auf Transwellmembranen kultiviert und nachfolgend mit Pt-Partikeln < 20 nm in den Konzentrationen 1 und 1000 ng/cm² ($\hat{=}$ 3,1 und 3113 ng/ml) für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die auf den Transwellmembranen angewachsenen Zellen durch Glutaraldehyd fixiert, mit Osmiumtetroxid zur Kontrastverbesserung gefärbt und mittels kritischer Punkt-Trocknung für die Elektronenmikroskopie vorbereitet (siehe Abschnitt 5.8). Die Aufnahme der Pt-NP in HT29-Zellen wurde mittels einer Kombination aus FIB („focused ion beam“) und SEM im Laboratorium für Elektronenmikroskopie (KIT) untersucht. Mithilfe der FIB-SEM-Technik kann das Material sowohl abgebildet als auch bearbeitet werden. Der über das zu untersuchende Objekt geführte Ionenstrahl (Ga^+) wechselwirkt derart stark mit der Oberfläche des Materials, dass diese Schicht für Schicht abgetragen wird. Dadurch wird ein schichtweiser Einblick in die Zelle gewährt, welcher in Kombination mit SEM die Detektion intrazellulärer Pt-Partikel ermöglicht. Der elementarspezifische Nachweis dieser Partikel wird durch Röntgenanalyse („energy-dispersive X-ray analysis“, EDX) erbracht. Abbildung 4.40 a zeigt eine SEM-Aufnahme einer HT29-Zelle. Diese Aufnahme entstand durch Detektion von SE, womit eine plastische Abbildung des zu untersuchenden Objekts ermöglicht wird. Näheres hierzu ist in Fleger et al. [1995] zu finden. Die Zelloberfläche weist eine für Darmzellen charakteristische Bürstensaumstruktur bestehend aus Mikrovilli auf. Darüber hinaus sind Verankerungen der Zelle zur Transwellmembran erkennbar.

Abbildung 4.40 b zeigt eine Aufnahme derselben Zelle erstellt mittels BSE. An drei verschiedenen Stellen der Zelloberfläche (gekennzeichnet durch Pfeile) können Agglomerate von Pt-NP erkannt werden. Unter Einsatz des fokussierten Ga^+ -Ionenstrahls des verwendeten FIB-SEM-Systems wurde die Zelle nachfolgend scheibenweise mit einer mittleren Scheibendicke von etwa 20 nm abgetragen. Drei der durch diesen Prozess gewonnenen Aufnahmen sind in Abb. 4.41 dargestellt, wobei die Abtragungstiefe von 4.41 a nach 4.41 c zunimmt. In allen drei Aufnahmen sind Pt-NP an verschiedenen Positionen innerhalb der Zelle (markiert durch Pfeile) zu erkennen. Der vergrößerte Ausschnitt in Abb. 4.41 b zeigt eine Nahaufnahme eines Partikels mit einem Durchmesser von ca. 70 nm. Dieser Pt-NP wurde mittels EDX-Spektralanalyse untersucht, um

¹Der Feret-Durchmesser eines Partikels definiert sich anhand seiner Projektionsfläche als der maximale Abstand zwischen deren begrenzenden Tangenten senkrecht zur Messrichtung [Kurzahls, 2003].

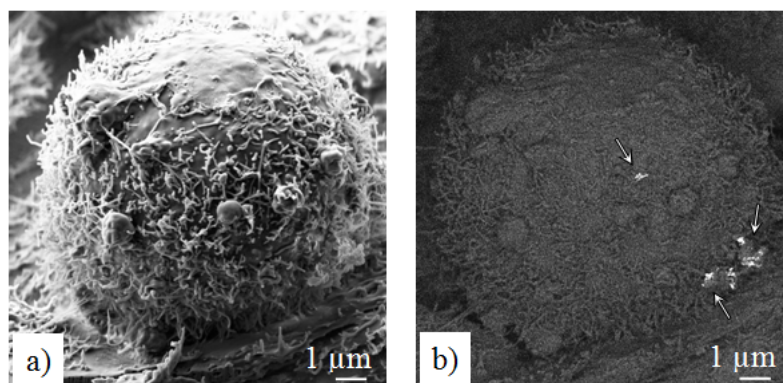


Abbildung 4.40: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer HT29-Zelle nach Inkubation mit $\text{Pt} < 20 \text{ nm}$ (Pt-CD_2 , 1 ng/cm^2). a) SE-SEM-Aufnahme einer HT29-Zelle; b) BSE-SEM-Aufnahme derselben Zelle, an deren Oberfläche Pt-Partikel haften (gekennzeichnet durch Pfeile). Erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT [Pelka et al., 2009].

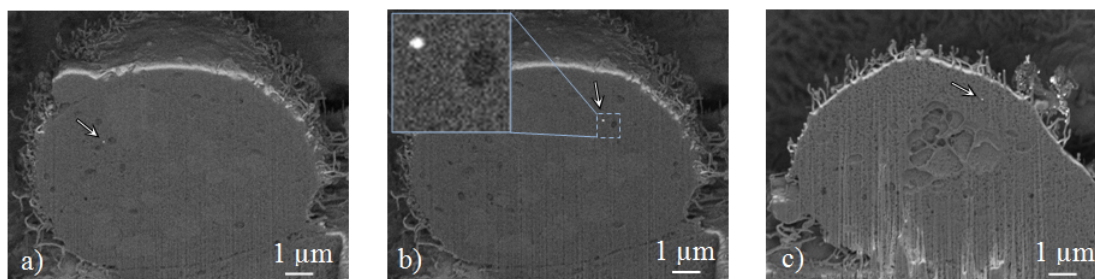


Abbildung 4.41: Nachweis von intrazellulären Pt-Partikeln nach Inkubation von HT29-Zellen mit Pt-Partikeln $< 20 \text{ nm}$ einer Konzentration von 1 ng/cm^2 über einen Zeitraum von 24 h mittels der FIB-SEM-Technik. a) - c) BSE-SEM-Aufnahmen einzelner Schichten der in 4.40 dargestellten HT29-Zelle (kleine Pt-Kluster markiert durch Pfeile, der vergrößerte Bildausschnitt in b zeigt einen einzelnen Pt-Partikel). Erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT [Pelka et al., 2009].

seine chemische Zusammensetzung im Vergleich zur angrenzenden Matrix zu analysieren. Abbildung 4.42 zeigt das EDX-Spektrum im Energiebereich von etwa 9 - 11,5 keV. Im Bereich der Matrix sind nur Ga und Os zu finden, wobei ersteres auf den Einsatz von Ga-Ionen während der Ionendünnung zurückzuführen ist. Das Auftreten der Os-L Linie ist durch das Anfärben der Zellen mit Osmiumtetroxid zu erklären. Zusätzlich zu Ga und Os ist Pt deutlich im Spektrum des Partikels auszumachen. Die Ergebnisse aus den FIB-SEM-Untersuchungen zeigen somit dass Pt-NP in HT29-Zellen aufgenommen werden. Eine subzelluläre Lokalisation des Nanomaterials ist aufgrund der unzureichenden Visualisierung zellulärer Strukturen nicht möglich, wird aber in fortführenden Arbeiten weiter untersucht.

Eine zelluläre Aufnahme von nanostrukturiertem Pt^0 wurde auch von Elder et al. [2007] und Asharani et al. [2010] nachgewiesen. Asharani et al. [2010] untersuchten die Internalisierung von Pt-Partikeln eines Durchmessers von 5 - 8 nm in humanen Glioblastomzellen (U251) und humanen Lungenfibroblasten (IMR-90) nach 48-stündiger Expositionsdauer unter Anwendung

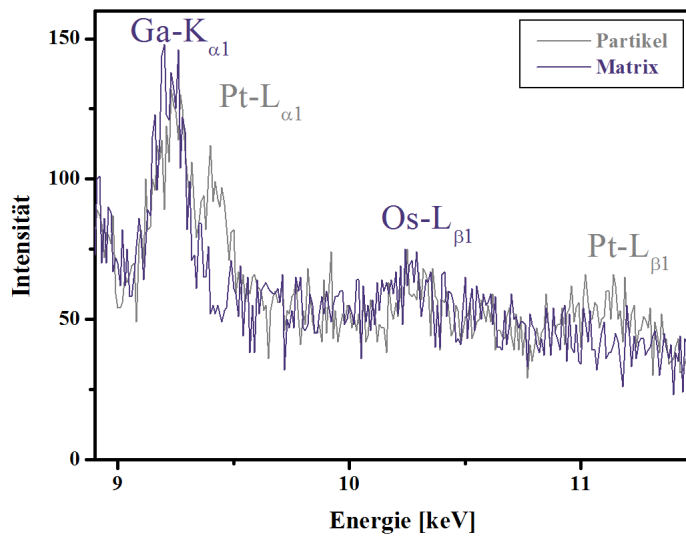


Abbildung 4.42: Vergleich der EDX-Spektren einer Zelle (Matrix) und eines in dieser enthaltenen Pt-Partikels. Erstellt im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT [Pelka et al., 2009].

der Ultramikrotomie und nachfolgender Detektion mittels TEM. Dabei waren im Zytoplasma der Zellen ausschließlich Pt-NP vorzufinden, während Partikelagglomerate in Vesikeln detektiert wurden. Elder et al. [2007] führten ihre Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von nanostrukturiertem Pt ebenfalls mittels TEM durch. Als Modellzelllinie wurden humane Zellen der Nabelschnurvene („human umbilical vein endothelial cells“, HUVEC) eingesetzt. Untersucht wurde die Internalisierung von Pt-Partikeln der Durchmesser 20 und 35 nm und unterschiedlicher Formen nach 24-stündiger Expositionsdauer. Hier wurden die Partikel vornehmlich im Zytoplasma vorgefunden. Dabei korrelierte das Ausmaß der zellulären Aufnahme invers mit der Partikelkonzentration, was auf die Bildung von Agglomeraten und die daraus resultierende Abnahme der spezifischen Oberfläche zurückgeführt wurde [Elder et al., 2007]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Agglomeration der Pt-Partikel bei Inkubation mit serumhaltigem Zellkulturmedium gegenüber der in Phosphatpuffer festgestellten Agglomeration vermindert war. Aufgrund dessen sowie infolge des in der vorliegenden Arbeit beobachteten Agglomerationsverhaltens von Pt-Partikeln < 20 nm in serumhaltigen Zellkulturmedium (siehe Abschnitt wurden alle nachfolgenden Untersuchungen unter Zusatz von 10 % FKS durchgeführt.

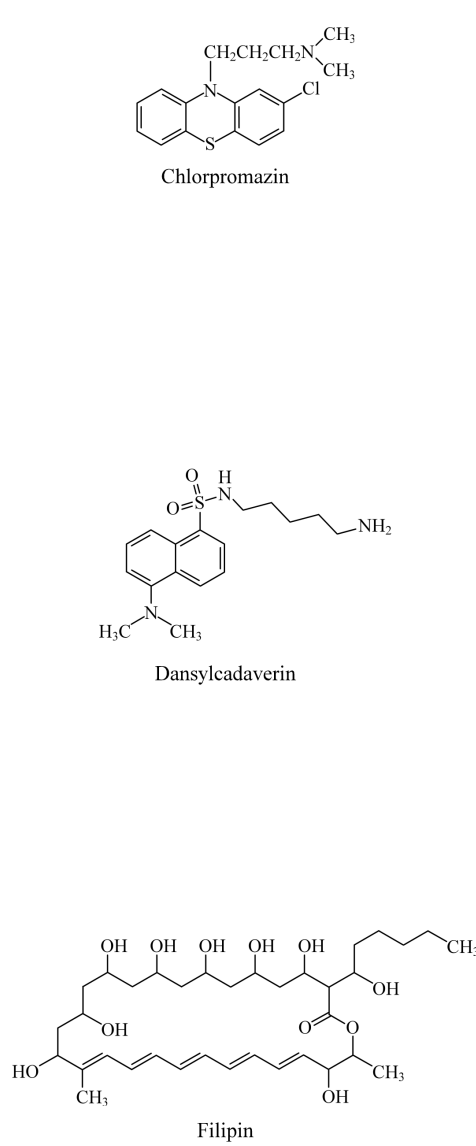
4.2.2.1 Zellverträglichkeit ausgewählter Hemmstoffe der zellulären Aufnahme

In Hinblick auf die in fortführenden Arbeiten geplante Aufklärung des Internalisierungsmechanismus von Pt-Partikeln wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zellverträglichkeit ausgewählter Hemmstoffe verschiedener zellulärer Aufnahmemechanismen in HT29-Zellen untersucht. Die Auswahl der für die Untersuchungen vorgesehenen Substanzen erfolgte aufgrund der in der Literatur beschriebenen Selektivität ihrer Hemmwirkung. Diese ist hinsichtlich einer eindeutigen Abgrenzung spezifischer Aufnahmemechanismen von entscheidender Bedeutung. Als Hemmstoffe

der Clathrin-abhängigen Endozytose (siehe Abschnitt 2.5.3.1) wurden Chlorpromazin (CP) und Dansylcadaverin (DC) gewählt. Die Hemmwirkung von CP basiert auf dessen Interaktion mit Clathrin-Molekülen, woraufhin diese von der Plasmamembran dissoziieren und damit eine zelluläre Aufnahme verhindert wird [Ivanov, 2008]. In der Literatur wird als Wirkoptimum ein Konzentrationsbereich von 50 - 100 μM vorgeschlagen. Da durch diese Substanz andere Aufnahmemechanismen wie bspw. die Phagozytose beeinflusst werden können [Ivanov, 2008], wurde DC als alternativer Hemmstoff ausgesucht. DC hemmt die Clathrin-abhängige Endozytose durch Stabilisierung der sog. „clathrin-coated pits“ (siehe Abschnitt 2.5.3.1). Laut Literatur wird diese Wirkung in einem Konzentrationsbereich von 100 - 300 μM erreicht. Zur Untersuchung einer Caveolae-vermittelten Internalisierung wurde das Polyen-Antibiotikum Filipin gewählt, dessen Hemmwirkung auf der Beeinträchtigung der Funktion cholesterreicher Domänen der Zellmembran beruht (siehe Abschnitt 2.5.3.1). Die üblicherweise eingesetzte Konzentration für diesen Hemmstoff ist 1 μM . Zur Untersuchung der Zellverträglichkeit dieser Hemmstoffe wurde der SRB-Assay herangezogen (siehe Abschnitt 5.10.2). Dabei wurde von den aus der Literatur als effektiv bekannten Hemmkonzentrationen ausgegangen. Abbildung 4.43 zeigt die Ergebnisse einer 24-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit den genannten Substanzen.

Zur grafischen Darstellung wurden die Messwerte der mit den einzelnen Hemmstoffen behandelten Proben in Verhältnis zum Messwert der jeweiligen Kontrolle (CP, Medium 10 % FKS; DC und Filipin, DMSO 1 %) gesetzt und als prozentuales Zellwachstum (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen. Wie in Abb. 4.43 a zu sehen, zeigt CP nach 24-stündiger Inkubationsdauer bereits in der niedrigsten getesteten Konzentration (1 μM) einen Einfluss auf das Wachstum der HT29-Zellen ($(72 \pm 29) \%$ gegenüber der Medium-Kontrolle), der sich im weiteren Konzentrationsverlauf deutlich verstärkt, so dass die Zellviabilität bei einer Konzentration von 50 μM im Vergleich zur Kontrolle um etwa 90 % vermindert ist. DC führt ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen Verlust der Zellviabilität. Bei einer Konzentration von 50 μM ist gegenüber der Kontrolle (DMSO 1 %) bereits eine wachstumshemmende Wirkung von etwa 18 % festzustellen (siehe Abb 4.43 b). Filipin zeigt über den gesamten Konzentrationsbereich (0,01 - 1 μM) eine leichte Abnahme der Zellviabilität, wobei diese bei einer Konzentration von 0,1 μM im Vergleich zur Kontrolle (DMSO 1 %) noch $85 \pm 4 \%$ beträgt (siehe Abb 4.43 b).

Insgesamt betrachtet, weisen HT29-Zellen gegenüber den Hemmstoffen CP und DC eine erhöhte Sensitivität auf. Da die Zellviabilität für weitere Untersuchungen $> 80 \%$ betragen sollte, kann CP nicht in den in der Literatur vorgeschlagenen Wirkkonzentrationen zur Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose in HT29-Zellen eingesetzt werden. Im Fall des Hemmstoffs DC sollte auf den Einsatz von Konzentrationen $> 50 \mu\text{M}$ verzichtet werden. Filipin zeigt sich bis zu einer Konzentration von 1 μM als zellverträglich. Aufgrund der Sensitivität der HT29-Zellen gegenüber diesen Hemmstoffen sollte überprüft werden, ob eine Hemmwirkung des betreffenden Aufnahmemechanismus schon bei niedrigeren Konzentrationen, als in der Literatur angegeben, erzielt wird. Anderenfalls muss insbesondere zur Untersuchung einer Clathrin-vermittelten Internalisierung auf andere Hemmstoffe zurückgegriffen werden.



stoffen zugehörigen chemischen Strukturen sind jeweils rechts abgebildet.

4.2.3 Intestinaler Transport von Pt-Partikeln

Mithilfe des Caco-2 Millicell®-Systems sollte der intestinale Transport von Pt-Partikeln anhand der Präparation Pt-CD2 ($\text{Pt} < 20\text{nm}$) untersucht werden, um einschätzen zu können, inwieweit eine Aufnahme dieses Nanomaterials aus dem GIT zu erwarten ist. Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde als Modell für die intestinale Barriere gewählt, da diese die Besonderheit hat innerhalb von 21 Tagen auszdifferenzieren und dabei dem Darmepithel ähnliche Eigenschaften auszubilden [Levy et al., 1995]. Für die Untersuchungen wurden Caco-2-Zellen gemäß der in Abschnitt 5.14 beschriebenen Vorgehensweise auf PET (Polyethylenterephthalat)-Membranen kultiviert und nach Ausbildung eines intakten Caco-2 Monolayers und Ausdifferenzierung mit Pt-Partikeln für 24 h inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Pt-Gehalt im apikalen und basolateralen Kompartiment nach Mediumabnahme, Zentrifugation und Veraschung mittels ICP-MS bestimmt. Die Intaktheit des Zellrasens wurde mithilfe des Markermoleküls Lucifer Yellow (LY) überprüft (siehe Abschnitt 5.14). Die Bestimmung des Pt-Gehalts mittels ICP-MS wurde von Dr. Ch. Hartinger am Institut für Anorganische Chemie der Universität Wien durchgeführt. Die Ergebnisse der 24-stündigen Inkubation sind in Abb. 4.44 zu sehen. Für die grafische Darstellung wurde der im Zellkulturmedium des apikalen Kompartiments bestimmte Pt-Gehalt, angegeben in nM, gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

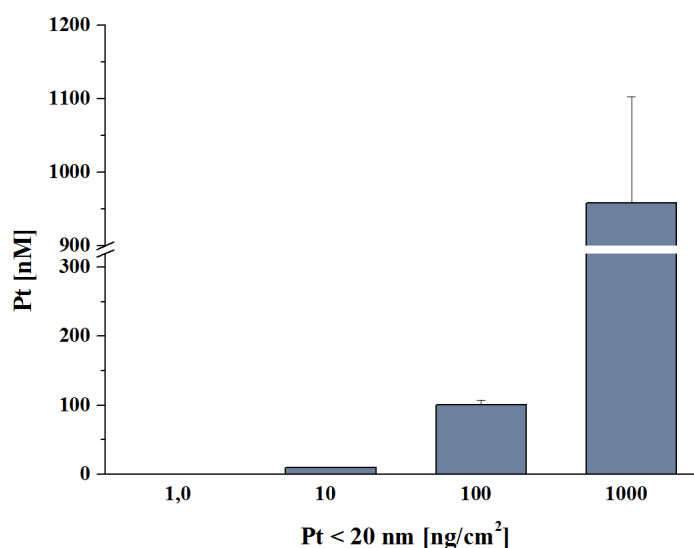


Abbildung 4.44: Pt-Gehalte im Zellkulturmedium des apikalen Kompartiments nach Inkubation von Caco-2-Zellen mit Pt-Partikeln eines Durchmessers $< 20\text{ nm}$ über einen Zeitraum von 24 h, bestimmt mittels ICP-MS (in Zusammenarbeit mit H. Gehrke). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von mind. drei unabhängigen Versuchen. $1,0\text{ ng/cm}^2 \hat{=} 1,75\text{ ng/ml}$ bzw. $8,9\text{ nM}$.

Wie in Abb. 4.44 zu sehen, ist nach einer 24-stündigen Inkubation von Pt-NP $< 20\text{ nm}$ ein konzentrationsabhängiger Anstieg von Pt im Medium des apikalen Kompartiments festzustellen. Der Pt-Gehalt im Medium des apikalen Kompartiments nach Inkubation mit der niedrigsten getesteten Konzentration von 1 ng/cm^2 ist nicht angegeben, da die Nachweisgrenze nicht erreicht wurde.

Mit zunehmender Konzentration ist auf apikaler Seite des Millicell®-Systems eine erhöhte Pt-Konzentration im Überstand des Mediums zu beobachten. So wird bei einer Konzentration von 10 ng/cm² ein Pt-Gehalt von (9 ± 1) nM erreicht. Bei weiterer Erhöhung der Pt-Konzentration ist jeweils etwa eine Verzehnfachung des Pt-Gehalts im apikal entnommenen Medium festzustellen ((100 ± 7) nM bei 100 ng/cm² bis (960 ± 145) nM bei 1000 ng/cm²). Hierbei entsprechen die Pt-Konzentrationen 100 ng/cm² und 1000 ng/cm² 175 ng/ml und 897 nM bzw. 1750 ng/ml und 8970 nM. Der Pt-Gehalt im Mediumüberstand des basolateralen Kompartiments lag oft unterhalb der Nachweis- und stets unterhalb der Bestimmungsgrenze, so dass hierzu keine Werte angegeben werden können. Damit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Pt nicht in das basolaterale Kompartiment transloziert. Insgesamt sind die Versuche mit dem Caco-2 Millicell®-System als Orientierung-gebende Messungen zu betrachten, die zur Erlangung weiterer Aussagekraft optimiert werden müssen. Dennoch können bezüglich der Löslichkeit von Pt im Zellkulturmedium Überlegungen angestellt werden. So könnte der Anstieg der Pt-Konzentration im Mediumüberstand des apikalen Kompartiments einen Hinweis auf die Bildung löslicher Pt-Spezies darstellen. Diese Überlegung beruht darauf, dass der Mediumüberstand nach seiner Abnahme aus dem apikalen Kompartiment nochmals für 1 h bei 20.000 g zentrifugiert und zum Veraschen ein Aliquot des daraus resultierenden Überstands entnommen wurde. Auch wenn durch den Zentrifugationsschritt nicht gewährleistet wird, dass sämtliche Pt-NP abgetrennt werden, ist festzustellen, dass der gemessene Pt-Gehalt in den verschiedenen Konzentrationsschritten jeweils etwa 10 % der Menge des eingesetzten Pt entspricht, was möglicherweise auf ein Verteilungsgleichgewicht hinweist. Von der Löslichkeit ultrafeiner Pt-Partikel wurde durch Artelt et al. [1999] berichtet. Dabei wurde beobachtet, dass die Löslichkeit der Partikel mit Verkleinerung des Durchmessers zunahm (siehe Abschnitt 2.9.4.2). Des Weiteren wurde durch Artelt et al. [1999] festgestellt, dass eine erhöhte Löslichkeit von Pt-Partikeln lediglich in 0,9 %-iger NaCl-Lösung auftritt. So stieg diese von 0,4 % (0,64 µM Pt) in wässriger Lösung auf 10 % in NaCl-Lösung (15,9 µM). Die Autoren vermuten, dass das Redoxpotential von metallischem Pt in Anwesenheit hoher Chlorid-Konzentrationen und Sauerstoffspuren stark erniedrigt wird, was zur Bildung von Tetra- und Hexachloroplatinaten führt [Artelt et al., 1999]. Da eine 0,9 %-ige NaCl-Lösung mit einem Chloridgehalt von 154 mM nur geringfügig über dem Gehalt von Cl⁻-Ionen im Medium liegt (118 mM), ist es durchaus denkbar, dass auch im Zellkulturmedium lösliche Pt-Spezies entstehen.

4.2.4 Zytotoxische Eigenschaften von Pt-Partikeln

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkungen von Pt-Partikeln in Abhängigkeit ihres Durchmessers wurden Zellviabilität, Zellwachstum, mitochondrielle Enzymaktivität und Membranintegrität als biologische Endpunkte gewählt. Hierdurch soll einerseits ein umfassendes Bild hinsichtlich des zytotoxischen Potentials der metallischen NP gewonnen und andererseits eine aus zytotoxischen Eigenschaften resultierende biologische Wirkung erfasst werden (siehe auch Abschnitt 4.1.3).

4.2.4.1 Einfluss auf das Zellwachstum

Zur Untersuchung des Einflusses der einzelnen Pt-Partikel auf das Zellwachstum von HT29-Zellen wurde der Sulforhodamin B (SRB)-Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 5.10.2). Die Abb. 4.45 a, b und c zeigen die Ergebnisse der Inkubationen mit Pt-Partikeln der Durchmesser > 100 nm, < 100 nm und < 20 nm über Zeiträume von 24, 48 und 72 h.

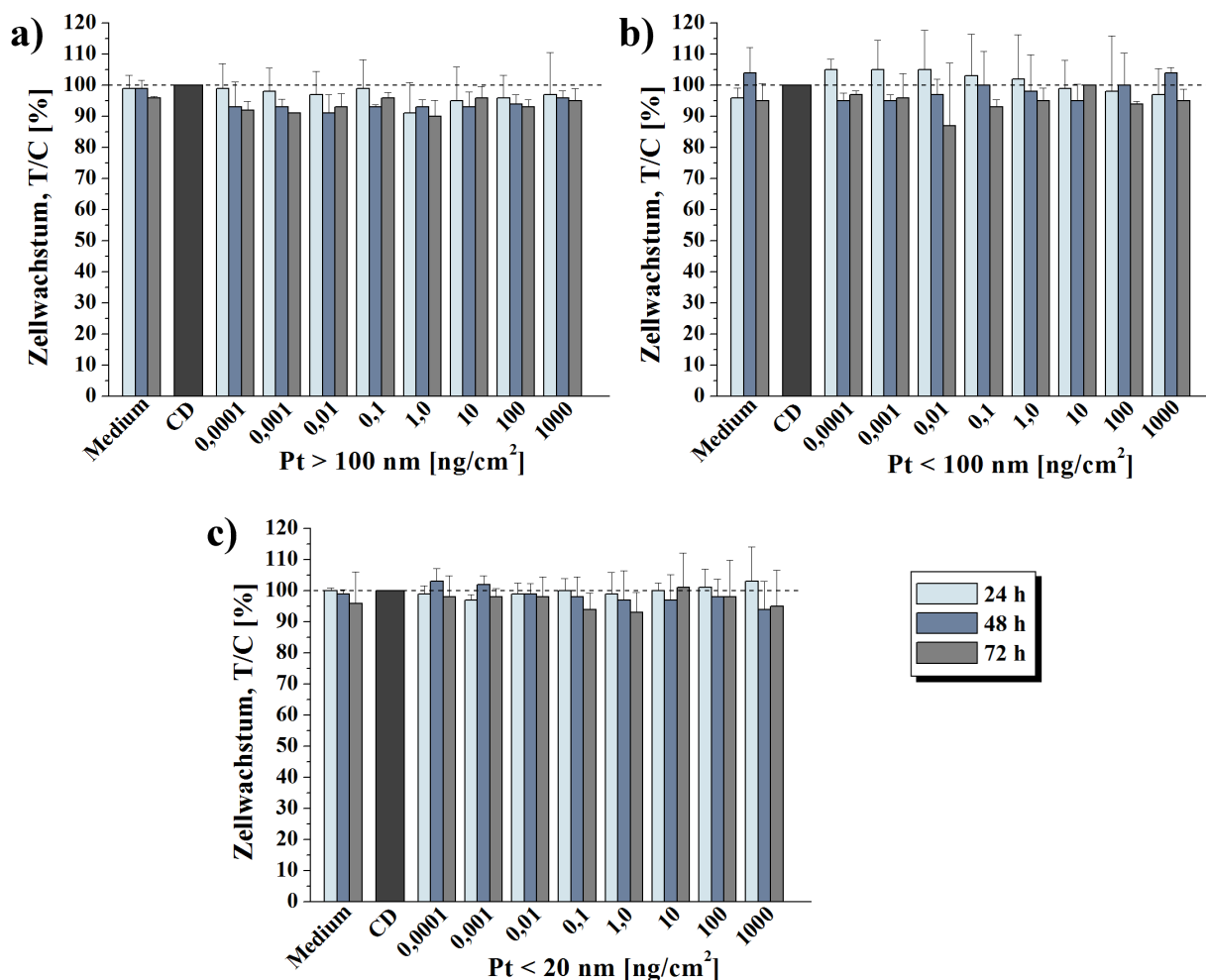


Abbildung 4.45: Einfluss von Pt > 100 (a), Pt < 100 (b) und Pt < 20 (c) nm auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Exposition, bestimmt mittels SRB-Assay. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Versuchen in einer Vierfachbestimmung in Relation zur β -Cyclodextrin (CD)-Kontrolle (Konzentration entspricht dem β -CD-Gehalt in der höchsten Pt-Konzentration, Wachstum = 100 %). 1,0 ng/cm² $\hat{=}$ 3,4 ng/ml bzw. 17,4 nM.

Wie aus den Abb. 4.45 a, b und c hervorgeht, ist nach einer Inkubationszeit von 24 h über den gesamten Konzentrationsbereich (0,0001 - 1000 ng/cm²) und unabhängig vom Durchmesser keinerlei Einfluss auf das Wachstum der HT29-Zellen durch die untersuchten Pt-Partikel zu beobachten. Auch mit zunehmender Expositionszeit von bis zu 72 h kann weder eine wachstumshemmende noch -stimulierende Wirkung der Pt-Partikel festgestellt werden. Damit kann gesagt werden, dass sowohl nanostrukturiertes Pt (< 100 nm) als auch Pt-Partikel > 100 nm bis zu einer

Konzentration von 1000 ng/cm² keinerlei Einfluss auf das Wachstum von HT29-Zellen nehmen.

4.2.4.2 Einfluss auf die mitochondrielle Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen in HT29-Zellen nach deren Exposition gegenüber Pt-Partikeln verschiedener Durchmesser wurde der WST-1-Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6). Als Positivkontrolle wurde Quercetin (500 µM, siehe Abschnitt 4.1.3.2) eingesetzt. Durch die Untersuchung der Vitalität der Mitochondrien können Rückschlüsse über die Viabilität der Zelle gezogen werden. Abbildung 4.46 zeigt das Ergebnis einer 24-stündigen Inkubation. Zur Auswertung wurden die Messwerte der mit den verschiedenen Pt-Partikeln behandelten Proben auf den Messwert der Kontrolle bezogen (β -Cyclodextrin (CD), mitochondrielle Aktivität = 100 %) und als prozentuale mitochondrielle Enzymaktivität (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

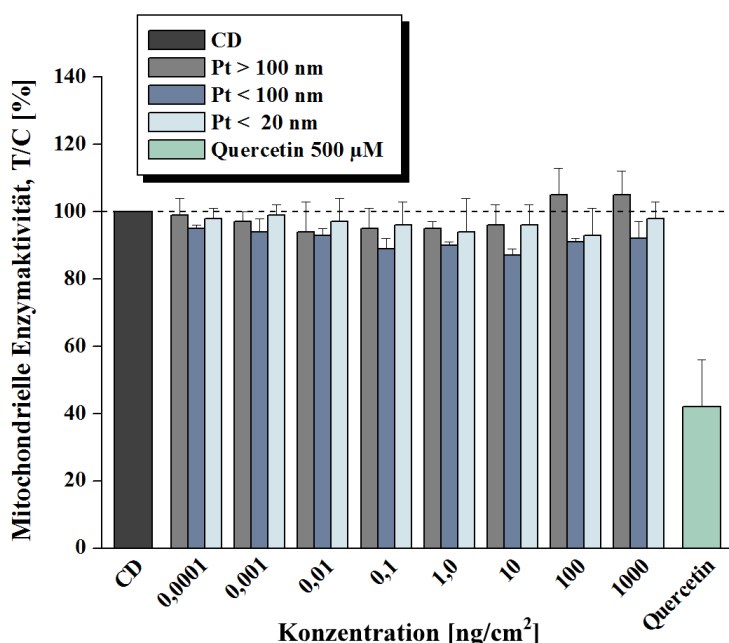


Abbildung 4.46: Einfluss von Pt-NP unterschiedlicher Durchmesser auf die Vitalität der Mitochondrien von HT29-Zellen nach 24-stündiger Exposition, bestimmt mittels WST-1-Assay. Quercetin (500 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung in Relation zur β -Cyclodextrin (CD)-Kontrolle (Konzentration entspricht dem β -CD-Gehalt in der höchsten Pt-Konzentration, Mitochondrielle Enzymaktivität = 100 %). 1,0 ng/cm² $\hat{=}$ 3,4 ng/ml bzw. 17,4 nM.

Wie in Abb. 4.46 zu sehen ist, ist die Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen in HT29-Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Pt-Partikeln der Durchmesser > 100 nm, < 100 nm und < 20 nm über einen Konzentrationsbereich von 0,0001 - 1000 ng/cm² mit der Enzymaktivität der mit der Kontrolle β -CD behandelten Zellen vergleichbar. Die mitochondriellen Dehydrogenasen der mit 500 µM Quercetin behandelten Zellen werden dagegen in ihrer Aktivität deutlich

beeinträchtigt ($(42 \pm 14) \%$ gegenüber der Kontrolle).

4.2.4.3 Einfluss auf die Membranintegrität der Zelle

Die Untersuchung des Einflusses von Pt-Partikeln unterschiedlicher Durchmesser auf die Integrität der Zellmembran von HT29-Zellen erfolgte anhand des LDH-Assays (siehe auch Abschnitt 5.10.4). In Abb. 4.47 ist das Ergebnis einer 24-stündigen Inkubation mit den verschiedenen Pt-Präparationen gezeigt. Alle Inkubationen wurden aus bereits in Abschnitt 4.1.3.3 erläuterten Gründen in 1 % FKS-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Triton-X 100 (1 %, siehe auch Abschnitt 4.1.3.3) eingesetzt.

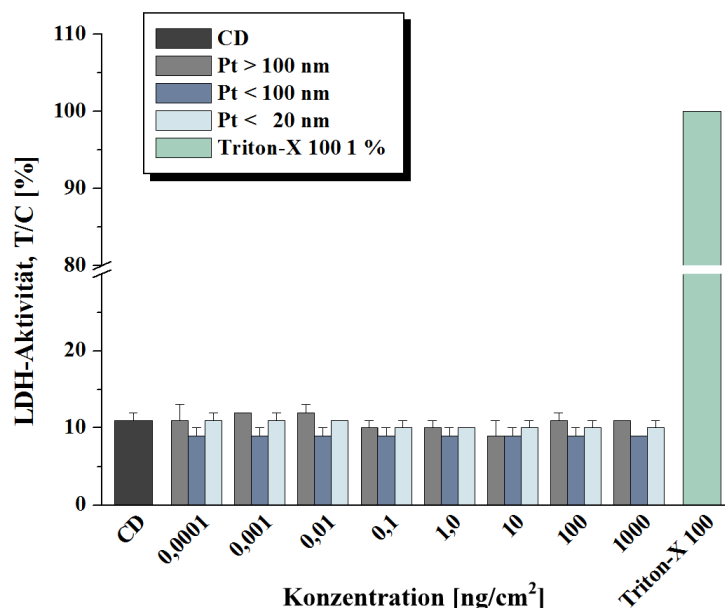


Abbildung 4.47: Einfluss von Pt-NP unterschiedlicher Durchmesser auf die Integrität der Zellmembran von HT29-Zellen nach 24-stündiger Exposition, bestimmt mittels LDH-Assay. Triton X-100 (1 %) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung in Relation zur Positivkontrolle (Triton X-100 (1 %), LDH-Aktivität = 100 %). Die Inkubation wurde in 1 % FKS-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt. $1,0 \text{ ng/cm}^2 \hat{=} 3,4 \text{ ng/ml}$ bzw. $17,4 \text{ nM}$.

Zur Auswertung wurden die Messwerte der mit Pt-Partikeln und β -CD behandelten Proben auf die auf 100 % LDH-Aktivität normierte Positivkontrolle (Triton X-100, 1 %) bezogen. In der grafischen Darstellung ist die LDH-Aktivität im Überstand des Zellkulturmediums behandelter Proben als (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

Das Ergebnis des LDH-Assays zeigt, dass nach 24-stündiger Exposition von HT29-Zellen gegenüber Pt-Partikeln der Durchmesser $> 100 \text{ nm}$, $< 100 \text{ nm}$ und $< 20 \text{ nm}$ im Vergleich zur Positivkontrolle bis zu einer Konzentration von 1000 ng/cm^2 lediglich eine geringe LDH-Aktivität von 9 - 12 % im Überstand des Zellkulturmediums zu messen ist. Dabei sind weder bei einem Vergleich der LDH-Aktivitäten der mit den einzelnen Pt-Präparationen behandelten Proben noch in Bezug

auf die LDH-Aktivität im Mediumüberstand β -CD-behandelter Proben signifikante Unterschiede festzustellen. Demnach kann eine Beeinflussung der Zellmembranintegrität von HT29-Zellen durch die untersuchten Pt-Präparationen unter den genannten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

4.2.4.4 Zusammenfassung und Diskussion der zytotoxischen Eigenschaften von Pt-Partikeln

Die untersuchten Pt-Partikel ($Pt > 100$ nm, $Pt < 100$ nm und $Pt < 20$ nm) zeigten unabhängig von ihrem Durchmesser über einen Konzentrationsbereich von 0,0001 - 1000 ng/cm² keine zytotoxischen Eigenschaften in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29. So wurden im gesamten Konzentrationsbereich nach einer 24-stündigen Expositionsdauer weder Zellviabilität (siehe Abb. 4.45 a, b und c) noch die Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen (siehe Abb. 4.46) beeinflusst. Auch eine Schädigung der Zellmembran war nicht festzustellen (siehe Abb. 4.47). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen war im Trypanblau-Ausschluss Assay, welcher parallel zu den Versuchen des Comet Assays und Bestimmung des tGSH-Gehalts durchgeführt wurde, nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber den einzelnen Pt-Präparationen keine Viabilitätsabnahme der HT29-Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren nahmen alle untersuchten Pt-Präparationen keinen Einfluss auf das Wachstum von HT29-Zellen. So waren mit zunehmender Inkubationsdauer von bis zu 72 h weder wachstumshemmende noch -stimulierende Effekte festzustellen (siehe Abb. 4.45 a, b und c). Dabei sind diese Ergebnisse nicht auf eine ausbleibende Internalisierung des Nanomaterials zurückzuführen, da diese exemplarisch an Pt-Partikeln < 20 nm mittels elektronenmikroskopischer Methoden nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.2).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Elder et al. [2007], in deren Studie nach Aufnahme von Pt-Partikeln eines Durchmessers von bis zu 35 nm in HUVE-Zellen keine Zytotoxizität dieses Nanomaterials nach 24-stündiger Expositionsdauer festgestellt werden konnte. Ebenso nach Verlängerung der Expositionsdauer auf 48 h wurde keine Beeinflussung des Zellwachstums gesehen. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Asharani et al. [2010], die die Zytotoxizität von Pt-Partikeln eines Durchmessers von 5 - 8 nm in humanen Glioblastomzellen (U251) und humanen Lungenfibroblasten (IMR-90) über die Zeiträume von 24, 48 und 72 h untersucht haben. Für die Untersuchungen wurde der „cell titer-Glo luminescent“-Viabilitätsassay herangezogen, der auf der Bestimmung der ATP-Konzentration als Maß für die Zellviabilität basiert. Sowohl in U251- als auch in IMR-90-Zellen konnte bereits nach einer Inkubationszeit von 24 h eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung beobachtet werden, so dass die Viabilität der Zellen in der höchsten getesteten Konzentration von 160 µg/ml etwa 55 % gegenüber der Kontrolle betrug. Jedoch wurde weder eine Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Expositionsdauer noch von der untersuchten Zelllinie festgestellt.

Da die durch Asharani et al. [2010] und Elder et al. [2007] getesteten Konzentrationsbereiche vergleichbar sind (10 - 160 µg/ml gegenüber 2,5 - 250 µg/ml), ist es unwahrscheinlich, dass dies den

Grund der unterschiedlichen Ergebnisse darstellt. Eine mögliche Erklärung liegt in dem weitaus kleineren Durchmesser und einer daraus möglicherweise resultierenden erhöhten Reaktivität der von Asharani et al. [2010] untersuchten Pt-Partikel. Zudem wurden für die Synthese der in den genannten Studien untersuchten Pt-Partikel verschiedene Vorläuferkomplexe eingesetzt, was ebenfalls einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse haben könnte. Aufgrund der begrenzten und divergierenden Datenlage hinsichtlich der toxikologischen Relevanz von nanostrukturiertem Pt kann derzeit keine allgemeine Aussage über das zytotoxische Potential dieses Nanomaterials gemacht werden.

4.2.5 Modulation des zellulären Redoxstatus durch Pt-Partikel

Zur Beurteilung einer den zellulären Redoxstatus modulierenden Wirkung von Pt-Partikeln unter besonderer Berücksichtigung ihres Durchmessers wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, durch die eine Beeinflussung des ROS-Gehalts sowie antioxidativer Verteidigungsmechanismen von HT29-Zellen nach Exposition gegenüber diesem Material erfasst werden sollte. In Hinblick auf die Modulation antioxidativer Verteidigungsmechanismen wurden analog zu den Untersuchungen an SWCNTs einerseits Auswirkungen einer Pt-Exposition auf den intrazellulären GSH-Gehalt und andererseits auf die Regulierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 untersucht.

4.2.5.1 Bildung reaktiver Spezies durch Pt-Partikel

Zur Erfassung der Modulation des zellulären ROS-Gehalts durch Pt-Partikel wurde der DCF-Assay angewandt (siehe Abschnitt 4.1.4.1). Abbildung 4.48 zeigt die Ergebnisse der Inkubationen von HT29-Zellen mit Pt-Partikeln der Durchmesser < 20 nm, < 100 nm und > 100 nm über einen Zeitraum von 3 h. Als Positivkontrolle wurde der Redoxcyclor Menadion (MEN, 20 μ M; siehe Abschnitt 2.6.1) eingesetzt. Die Fluoreszenzzunahmen der mit Pt-Partikeln behandelten Proben wurden auf die gleich 100 % gesetzte Kontrolle (CD) bezogen und in der grafischen Darstellung als prozentuale Fluoreszenz (T/C) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen.

Wie aus Abbildung 4.48 hervorgeht, führt der Redoxcyclor MEN nach 3-stündiger Inkubation zu einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf (293 ± 70) % gegenüber der Kontrolle. Nach Exposition der Zellen gegenüber Pt-Partikeln ist unabhängig vom Partikeldurchmesser indes keine deutliche Beeinflussung des zellulären ROS-Gehalts zu beobachten. Die Fluoreszenzintensitäten der Pt-behandelten Proben verbleiben unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten über den gesamten Konzentrationsbereich von 0,0001 - 1000 ng/cm² auf dem Niveau der β -CD-Kontrolle. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass sowohl nanostrukturiertes Pt als auch Pt-Partikel > 100 nm unter den genannten Versuchsbedingungen nicht zur Induktion von oxidativem Stress in HT29-Zellen beitragen.

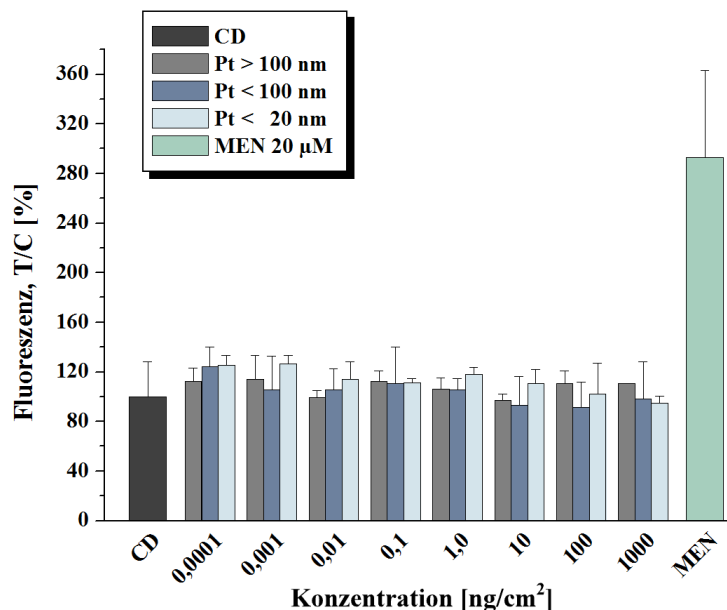


Abbildung 4.48: Modulation des zellulären ROS-Gehalts in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit Pt-NP verschiedener Durchmesser, bestimmt mittels DCF-Assay. Menadion (MEN, 20 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von mind. drei unabhängigen Versuchen in einer Sechsfachbestimmung in Relation zur β -Cyclodextrin (CD)-Kontrolle (Konzentration entspricht dem β -CD-Gehalt in der höchsten Pt-Konzentration). $1,0 \text{ ng/cm}^2 \hat{=} 3,4 \text{ ng/ml}$ bzw. $17,4 \text{ nM}$.

4.2.5.2 Einfluss von Pt-Partikeln auf den zellulären Glutathiongehalt

Zur Verifizierung der Ergebnisse des DCF-Assays wurde der Einfluss der Pt-Partikel auf den zellulären Glutathiongehalt mittels GSH-Assay nach Tietze [1969] untersucht. Diese Methode ermöglicht sowohl die Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts (Summe aus GSH und GSSG; „total“ GSH, tGSH) als auch der einzelnen Komponenten (siehe Abschnitt 4.1.4.4). Hinsichtlich einer Beeinflussung des GSSG-Gehalts durch Pt-Partikel kann aus bereits in Abschnitt 4.1.4.4 erläuterten Gründen keine Aussage gemacht werden, weshalb im Folgenden ausschließlich auf die Ergebnisse zur Modulation des tGSH-Gehalts eingegangen wird.

Der Einfluss der verschiedenen Pt-Präparationen auf den zellulären tGSH-Gehalt in HT29-Zellen wurde sowohl nach 3- als auch nach 24-stündiger Exposition untersucht. Damit sollte zudem die Bedeutung der Expositionsdauer für die biologischen Wirkungen der Pt-Partikel erfasst werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.49 und 4.50 dargestellt. Die Positivkontrollen wurden entsprechend der Inkubationsdauer gewählt. Als Positivkontrolle für die 3-stündige Exposition diente Menadion (MEN, 20 µM, siehe Abschnitt 2.6.1), für die 24-stündige Exposition BSO (siehe Abschnitt 4.1.4.4). Für beide Inkubationszeiträume wurden die auf 1 mg Protein normierten tGSH-Gehalte der behandelten Proben auf die zugehörige Kontrolle bezogen (Bezug für Pt-NP = CD, Bezug für MEN und BSO = Medium 10 % FKS) und sind jeweils als prozentualer tGSH-Gehalt (T/C) grafisch dargestellt.

Wie in Abb. 4.49 zu sehen, zeigen Pt-Partikel $> 100 \text{ nm}$ nach 3-stündiger Inkubation über den ge-

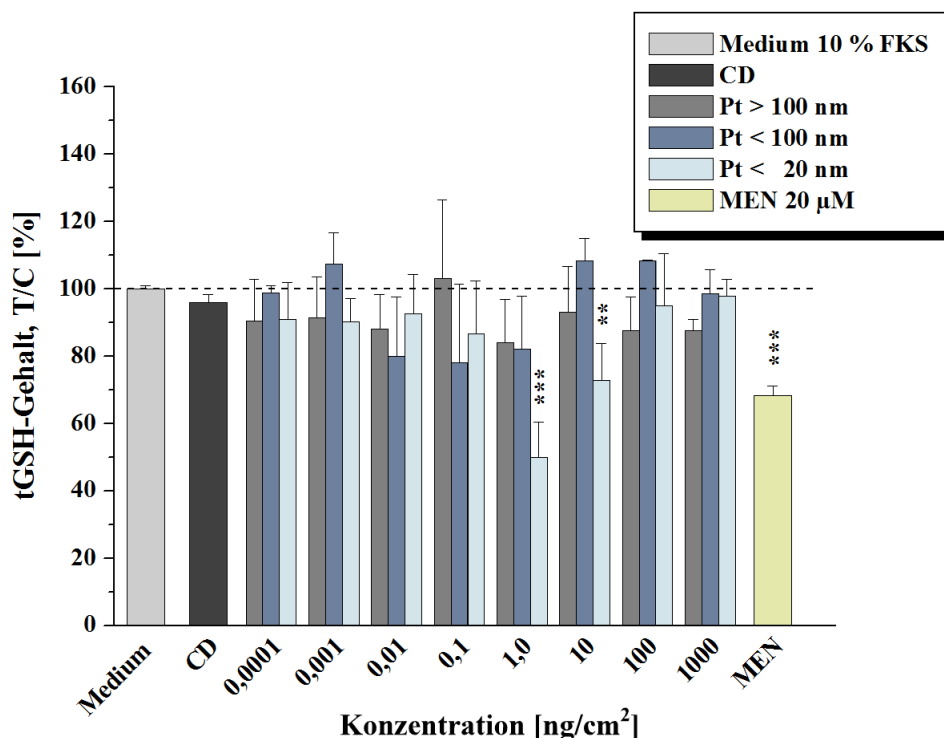


Abbildung 4.49: tGSH-Gehalt in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit Pt-NP in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers, bestimmt mittels GSH-Assay nach Tietze [1969] (in Zusammenarbeit mit H. Gehrke, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2008). Der tGSH-Gehalt ist auf 1 mg Protein normiert (100 % = $28,98 \pm 3,31$ nmol/mg Protein). Menadion (MEN, 20 μ M) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für Pt-NP = CD (β -Cyclodextrin), Signifikanzbezug für MEN = Medium 10 % FKS) wurden mittels Student's *t*-Test anhand der Absolutwerte (nmol tGSH/mg Protein) berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). 1,0 ng/cm² $\hat{=}$ 5,8 ng/ml bzw. 29,7 nM.

samten Konzentrationsbereich (0,0001 - 1000 ng/cm²; $\hat{=}$ 0,0006 - 5800 ng/ml bzw. 0,003 - 29.731 nM) keinerlei Auswirkung auf den tGSH-Gehalt von HT29-Zellen. Die tGSH-Gehalte verbleiben unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten auf dem Niveau der β -CD-Kontrolle. Nach Inkubation mit Pt-Partikeln < 100 nm deutet sich in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 ng/cm² eine leichte Verringerung des tGSH-Gehalts an, während dieser in Konzentrationen $< 0,01$ und > 1 ng/cm² gegenüber der Kontrolle leicht erhöht ist. Unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten ist die Beeinflussung des zellulären tGSH-Gehalts durch diese Pt-Präparation jedoch als gering einzustufen. Eine 3-stündige Exposition von HT29-Zellen gegenüber der Pt-Präparation, die vornehmlich Pt-Partikel eines Durchmessers < 20 nm enthält, führt in einem Konzentrationsbereich von 0,0001 - 0,1 ng/cm² zunächst zu keiner deutlichen Beeinflussung des zellulären tGSH-Gehalts. Mit zunehmender Partikeldichte (1 - 10 ng/cm²) wird der tGSH-Gehalt der Zellen indes signifikant vermindert. Dabei wird bei einer Konzentration von 1 ng/cm² ($\hat{=}$ 5,8 ng/ml bzw. 29,7 nM) die maximale Wirkung mit einer Senkung des tGSH-Gehalts auf (50 ± 11) % gegenüber der β -CD-Kontrolle erreicht. Damit ist die bei dieser Konzentration beobachtete Erniedrigung

des tGSH-Gehalts stärker ausgeprägt, als es nach Behandlung der HT29-Zellen mit der Positivkontrolle MEN (20 μM) zu beobachten ist ($(68 \pm 3) \%$). Im weiteren Konzentrationsverlauf ist eine Zunahme des tGSH-Gehalts zu beobachten, so dass sich dieser bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000 ng/cm^2 nahezu auf dem Niveau der Kontrolle bewegt. Ein Vergleich der Wirkungen der einzelnen Pt-Präparationen führt zu dem Schluss, dass der tGSH-Gehalt mit abnehmendem Durchmesser der Pt-Partikel verstärkt vermindert wird.

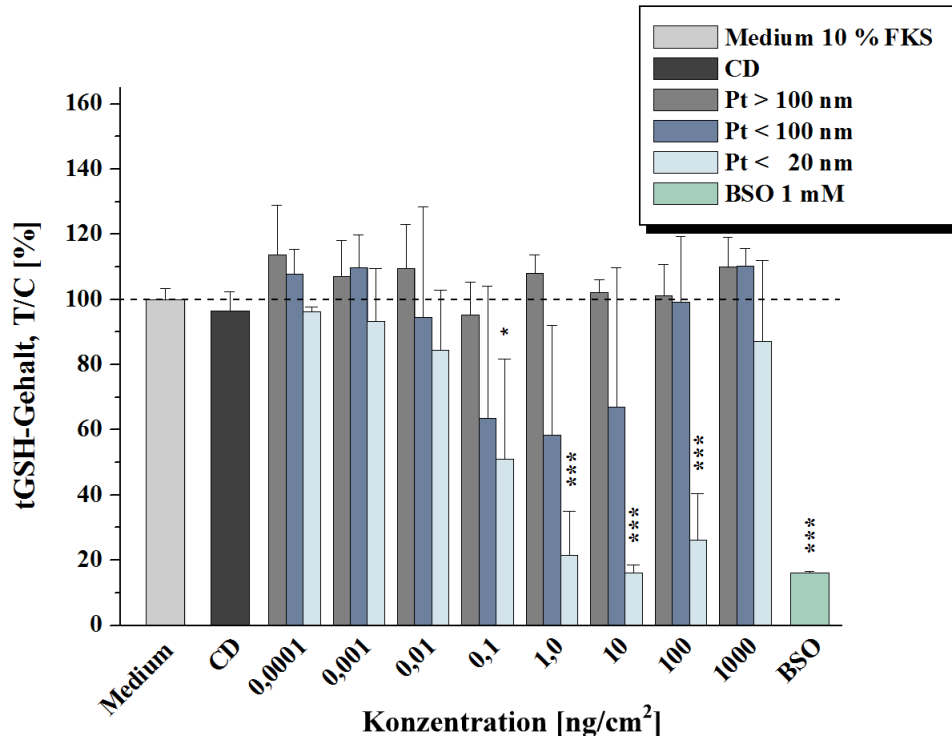


Abbildung 4.50: tGSH-Gehalt in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Pt-NP in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers, bestimmt mittels GSH-Assay nach Tietze [1969] (in Zusammenarbeit mit H. Gehrke, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2008). Der tGSH-Gehalt ist auf 1 mg Protein normiert (100 % = $27,05 \pm 1,48$ nmol/mg Protein). Buthioninsulfoximin (BSO, 1 mM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für Pt-NP = CD (β -Cyclodextrin), Signifikanzbezug für BSO = Medium 10 % FKS) wurden mittels Student's t -Test anhand der Absolutwerte (nmol tGSH/mg Protein) berechnet (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$). $1,0 \text{ ng}/\text{cm}^2 \hat{=} 5,8 \text{ ng}/\text{ml}$ bzw. $29,7 \text{ nM}$.

Nach 24-stündiger Inkubation der HT29-Zellen mit Pt-Partikeln $> 100 \text{ nm}$ wird der zelluläre tGSH-Gehalt über den gesamten Konzentrationsbereich ($0,0001 - 1000 \text{ ng}/\text{cm}^2$) nicht beeinflusst (siehe Abb. 4.50). Die Exposition gegenüber der aus Pt-Partikeln eines Durchmessers $< 100 \text{ nm}$ bestehenden Pt-Präparation führt im Konzentrationsbereich von $0,1 - 10 \text{ ng}/\text{cm}^2$ ($\hat{=} 0,6 - 58 \text{ ng}/\text{ml}$ bzw. $3,0 - 297 \text{ nM}$) zu einer Abnahme des zellulären tGSH-Gehalts. Außerhalb dieses Konzentrationsbereichs ist hingegen keine Beeinflussung des tGSH-Gehalts zu erkennen. Jedoch ist die im Konzentrationsbereich von $0,1 - 10 \text{ ng}/\text{cm}^2$ beobachtete Erniedrigung des tGSH-Gehalts unter Einbezug der Schwankungsbreiten nicht signifikant und daher als Tendenz zu betrachten.

Nach Exposition der Zellen gegenüber Pt-Partikeln eines Durchmessers < 20 nm ist unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten bis zu einer Konzentration von $0,01$ ng/cm² kein Einfluss dieser Partikel auf den zellulären tGSH-Gehalt festzustellen (siehe Abb. 4.50). Ab einer Konzentration von $0,1$ ng/cm² wird der tGSH-Gehalt der untersuchten Zelllinie hingegen signifikant verringert. So ist bei dieser Konzentration der tGSH-Gehalt bereits um etwa 20 % gegenüber der Kontrolle (β -CD) vermindert. Dieser Effekt verstärkt sich mit zunehmender Konzentration, so dass bei einer Partikeldichte von 10 ng/cm² mit einem im Vergleich zur Kontrolle um etwa 84 % erniedrigten tGSH-Gehalt in dem untersuchten Konzentrationsbereich eine maximale Verminderung erreicht wird. Damit ist der bei dieser Konzentration beobachtete Effekt mit dem durch die Positivkontrolle festgestellten Absinken des zellulären tGSH-Gehalts auf (16 ± 1) % gegenüber der Medium-Kontrolle vergleichbar. Mit weiter ansteigender Partikeldichte ist wiederum eine Zunahme an zellulärem GSH festzustellen, derart dass der Gehalt des Antioxidans in der höchsten getesteten Konzentration (1000 ng/cm²) unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite nahezu auf das Niveau der β -CD-Kontrolle steigt.

Insgesamt betrachtet, ist lediglich durch Pt-Partikel < 100 nm und < 20 nm ein Einfluss auf den tGSH-Gehalt von HT29-Zellen zu beobachten. Dabei zeigt sich für Pt-Präparationen ein vergleichbarer Effektverlauf, welcher einer U-Kurve gleicht. Die stärkste Wirkung wird allerdings durch die Pt-Partikel mit dem kleinsten Durchmesser (< 20 nm) erreicht. Dieses Ergebnis entspricht der nach 3-stündiger Inkubationsdauer festgestellten Korrelation zwischen der Verminderung des tGSH-Gehalts und dem Partikeldurchmesser. Des Weiteren ist bei einem Vergleich der Ergebnisse beider Inkubationszeiträume insbesondere für die Pt-Präparation, die vorwiegend aus Pt-Partikeln eines Durchmessers < 20 nm besteht, eine signifikante Verstärkung der beobachteten Effekte im Vergleich zu der 3-stündigen Expositionsdauer festzustellen. Dabei prägt sich der bereits nach 3-stündiger Inkubation angedeutete U-förmige Effektverlauf stärker aus, was sich in einem größeren Wirkfenster widerspiegelt ($1 - 10$ ng/cm² nach 3-stündiger Inkubation gegenüber $0,1 - 100$ ng/cm² nach 24-stündiger Inkubation). Im Gegensatz zur 3-stündigen Inkubation, ist nach einer Expositionsdauer von 24 h die stärkste Wirkung bei einer Konzentration von 10 ng/cm² ($\hat{=}$ 58 ng/ml bzw. 297 nM) zu beobachten (gegenüber der 3 h Inkubation mit einer Konzentration von 1 ng/cm²). Unter Einbezug der Schwankungsbreite bei einer Konzentration von 1 ng/cm² kann jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob sich mit zunehmender Inkubationszeit das Wirkmaximum zu höheren Konzentrationen verschiebt. Für Pt-Partikel < 100 nm deutet sich ebenfalls eine mit zunehmender Expositionsdauer ansteigende Beeinflussung des tGSH-Gehalts an. Diese erreicht allerdings keine statistische Signifikanz. Pt-Partikel > 100 nm zeigen indes unabhängig von der Inkubationsdauer keine Wirkung auf den tGSH-Gehalt von HT29-Zellen.

4.2.5.3 Einfluss von Pt-Partikeln auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2

Zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse aus dem DCF- und GSH-Assay wurde der Einfluss von Pt-Partikeln auf den nukleären Gehalt des Transkriptionsfaktors Nrf2 untersucht. Dieser wird infolge von zellulären Stressbedingungen wie dem Einwirken elektrophiler Spezies aktiviert und initiiert zelluläre Mechanismen zu deren Abwehr (siehe Abschnitt 4.1.4.3).

Eine Beeinflussung des nukleären Nrf2-Gehalts durch Pt-Partikel in HT29-Zellen wurde mittels Western Blot Analyse untersucht (siehe Abschnitt 4.1.4.3). α -Tubulin wurde als Beladungskontrolle mitgeführt. Der getestete Konzentrationsbereich wurde in Anlehnung an die im GSH-Assay beobachteten Effekte festgelegt. Abbildung 4.51 zeigt das Ergebnis der 3-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit Pt-Partikeln der Durchmesser < 100 nm und > 100 nm.

Die nukleären Nrf2-Gehalte der mit Pt-Partikeln behandelten Proben und der β -CD-Kontrolle wurden zueinander in Bezug gesetzt und der prozentuale Nrf2-Gehalt im Zellkern als (T/C) in [%] gegen die getesteten Konzentrationen grafisch aufgetragen.

Wie aus Abb. 4.51 deutlich wird, führen nach einer Expositionsdauer von 3 h weder nanostrukturierte Pt-Partikel (Durchmessers < 100 nm) noch Pt-Partikel eines Durchmessers > 100 nm zu einer Modulation des nukleären Nrf2 Gehalts. Der Nrf2-Gehalt bewegt sich über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ($0,1 - 1000$ ng/cm²) annähernd auf dem Niveau der β -CD-Kontrolle. Auch für Pt-Partikel < 20 nm konnte in der untersuchten Zelllinie keine Beeinflussung der Translokation von Nrf2 festgestellt werden (Untersuchungen durchgeführt von K. Sommerfeld und U. Böttler, Daten nicht gezeigt).

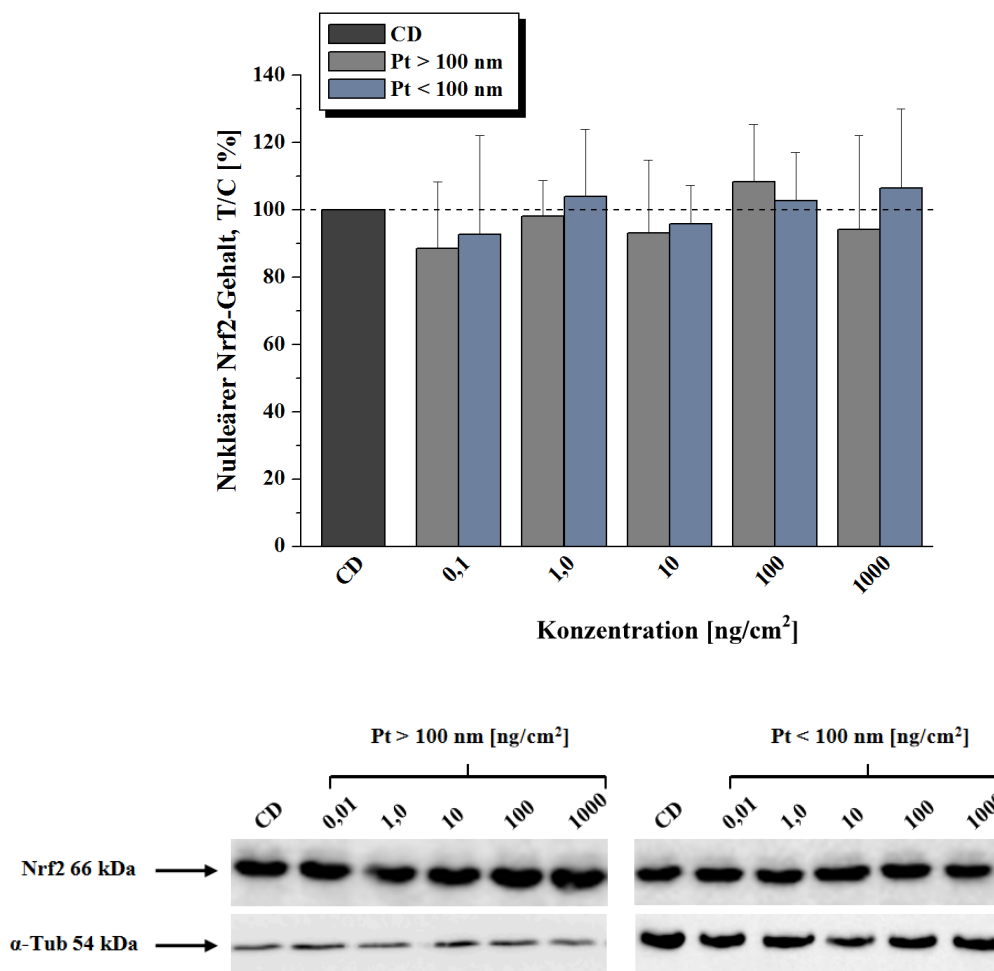


Abbildung 4.51: Nukleärer Nrf2-Gehalt in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit Pt-Partikeln der Durchmesser < 100 nm und > 100 nm, bestimmt mittels Western Blot Analyse (durchgeführt von Ute Böttler). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD und repräsentative Blotbilder von mind. vier unabhängigen Versuchen in Relation zur Kontrolle (β -Cyclodextrin (CD), Nukleärer Nrf2-Gehalt = 100 %). 1,0 ng/cm² $\hat{=}$ 7,6 ng/ml bzw. 38,9 nM.

4.2.5.4 Zusammenfassung und Diskussion zur Modulation des zellulären Redoxstatus durch Pt-Partikel unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pt-Präparationen zeigten nach 3-stündiger Expositionsdauer unabhängig vom jeweiligen Durchmesser über den gesamten Konzentrationsbereich von 0,0001 - 1000 ng/cm² keine Beeinflussung der Fluoreszenzintensität im DCF-Assay, was darauf hindeutet, dass durch diese Pt-Partikel kein oxidativer Stress induziert wird (siehe Abb. 4.48). Dieses Ergebnis korreliert mit den Beobachtungen von Elder et al. [2007], die unter zellfreien Bedingungen für Pt-Partikel der Durchmesser 11 und 35 nm ebenfalls keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität im DCF-Assay feststellen konnten. Auch in anderen Studien konnte keine durch Pt-Partikel induzierte Bildung von ROS beobachtet werden. Vielmehr werden Pt-NP Eigenschaften von Radikalfängern zugeschrieben [Kajita et al., 2007; Onizawa et al., 2009;

Zhang et al., 2010; Watanabe et al., 2009]. So stellten bspw. Kajita et al. [2007] fest, dass Pektin-stabilisierte Pt-Partikel eines Durchmessers von $4,7 \pm 1,5$ nm sowohl H_2O_2 als auch $\text{O}_2^{\bullet-}$ effektiv abfangen, wobei die Wirkqualität mit der des H_2O_2 -abbauenden Enzyms Katalase bzw. der des $\text{O}_2^{\bullet-}$ -umwandelnden Enzyms Superoxiddismutase vergleichbar war. Dem gegenüber steht die Studie von Asharani et al. [2010], in welcher eine konzentrationsabhängige Generierung von H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch Pt-Partikel eines Durchmessers von 5 - 8 nm in U251- und IMR-90-Zellen nach einer Expositionsdauer von 2 h beobachtet wurde. Da im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen andere Zelllinien sowie höhere Konzentrationen eingesetzt wurden, sind die Ergebnisse bedingt vergleichbar. Jedoch kann eine Modulation des zellulären ROS-Gehalts infolge eines negativen Ergebnisses im DCF-Assay nicht ausgeschlossen werden, da dieses Testsystem potentiell Fehlerquellen aufweist. So ist in der Literatur beschrieben, dass der DCF-Assay aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs möglichst im Dunkeln durchgeführt werden sollte, da DCF-DA in Anwesenheit reduzierender Agentien, wie NADH oder GSH, photoreduziert wird [Marchesi et al., 1999]. Zudem wurde u.a. festgestellt, dass die Erfassung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ und $\text{OH}^\bullet$ mit dieser Methode zu unsteten Ergebnissen führt [LeBel et al., 1992; Rota et al., 1999]. Vor diesem Hintergrund wurden zusätzlich Untersuchungen zur Modulation des tGSH- sowie des nukleären Nrf2-Gehalts durch die einzelnen Pt-Präparationen durchgeführt, da diese beiden Messgrößen Indikatoren für den Redoxstatus der Zelle darstellen. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die in dieser Arbeit untersuchten Pt-Präparationen nach einer Inkubationszeit von 3 h unabhängig von ihrem jeweiligen Durchmesser über einen Konzentrationsbereich 0,1 - 1000 ng/cm² ($\hat{=}$ 0,6 - 5800 ng/ml bzw. 3,0 - 29.731 nM) keinen Einfluss auf den Nrf2-Gehalt im Zellkern ausüben (siehe Abb. 4.51). Damit stimmt dieses Ergebnis mit den im DCF-Assay gemachten Beobachtungen überein. Jedoch war eine durch die Pt-Partikel vermittelte Beeinflussung des intrazellulären tGSH-Gehalts festzustellen, welche in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers und der Expositionsdauer unterschiedlich stark ausgeprägt war. So zeigten Pt-Partikel > 100 nm weder nach 3- noch nach 24-stündiger Inkubationszeit eine Wirkung auf den tGSH-Gehalt von HT29-Zellen. Pt-Partikel der Durchmesser < 100 nm und < 20 nm führten indes bereits nach einer Expositionszeit von 3 h zu einer Erniedrigung des zellulären tGSH-Gehalts (siehe Abb. 4.49 und 4.50). Diese Wirkung wurde durch Verlängerung der Inkubationsdauer von 3 auf 24 h deutlich verstärkt. Dabei zeigten die Pt-Partikel mit dem kleinsten Durchmesser (< 20 nm) die deutlichste tGSH-Erniedrigung, so dass gesagt werden kann, dass die beobachteten Wirkungen mit abnehmendem Partikeldurchmesser zunehmen. Des Weiteren war für beide Pt-Präparationen ein vergleichbarer Effektverlauf, der einer U-Kurve gleicht, festzustellen. Dieser war nach einer Inkubationszeit von 24 h im Vergleich zur 3-stündigen Inkubationsdauer stärker ausgeprägt. So erstreckte sich der Wirkungsbereich von Pt-Partikeln < 100 nm nach einer Expositionsdauer von 24 h über einen Konzentrationsbereich von 0,1 - 10 ng/cm² mit einem maximalen Effekt bei der Konzentration von 1 ng/cm² ($\hat{=}$ 5,8 ng/ml bzw. 29,7 nM). Das Wirkfenster der Pt-Präparation, die vornehmlich Pt-Partikel eines Durchmessers < 20 nm enthielt, lag in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 100 ng/cm², wobei die stärkste Wirkung bei einer Partikeldichte von 1 - 10 ng/cm² erreicht wurde. In den jeweils darüber bzw. darunter liegenden Konzentrationen war indes kein deutlicher Einfluss auf den tGSH-Gehalt erkennbar. Eine Erklärung für

die mit zunehmender Partikeldichte festzustellende Abnahme der tGSH-Depletion liegt möglicherweise in einer Agglomeration der Pt-Partikel. Wenngleich alle Pt-Präparationen unmittelbar vor der Inkubation mittels Ultraschallbehandlung in 10 % FKS-haltigem Zellkulturmedium dispergiert wurden, was laut Elder et al. [2007] eine Agglomeration der Partikel aufgrund einer abschirmenden Wirkung des FKS minimiert, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei hoher Partikeldichte durch eine erhöhte elektrostatische Anziehung eine Zusammenlagerung der Partikel stattfindet. Hierdurch würde ihre spezifische Oberfläche und damit ihre Reaktivität reduziert, was den Rückgang der beobachteten Effekte erklären würde (siehe Abschnitt 2.4). Unterstützt wird diese Hypothese durch die ausbleibende Wirkung der Pt-Präparation $Pt > 100$ nm, die nach der in Abschnitt 4.2.1.1 beschriebenen elektronenmikroskopischen Analyse vornehmlich aus Agglomeraten von bis zu 500 nm bestand. Resultierend daraus wäre es zudem denkbar, dass die zelluläre Aufnahme von Pt-Agglomeraten im Vergleich zu Pt-Partikeln erschwert ist bzw. durch einen anderen Mechanismus erfolgt, was die Beobachtungen zusätzlich erklären würde. Eine erhöhte Reaktivität und Zellgängigkeit von Pt-Partikeln mit abnehmendem Partikeldurchmesser wurde bereits durch Artelt et al. [1999] und Zeller [2004] festgestellt (siehe Abschnitt 2.9.4.2). Auch für andere Nanomaterialien wie Fe_2O_3/SiO_2 -NP konnte eine mit zunehmender Partikeldichte abnehmende Wirkung festgestellt werden [Limbach et al., 2007]. Dabei wurde eine maximale ROS-Bildung bei einem Fe-Gehalt von 1 - 5 wt.% beobachtet, während in ansteigenden Fe-Konzentrationen ein Rückgang des Effekts auf das Niveau der Kontrolle zu sehen war.

Eine durch Nanomaterie induzierte Erniedrigung des zellulären GSH-Gehalts wird in der Literatur vornehmlich im Zusammenhang mit einer erhöhten Generierung von ROS beschrieben [Hussain et al., 2005; Shvedova et al., 2003]. Dieser Mechanismus erscheint für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pt-Partikel unwahrscheinlich, da sowohl im DCF-Assay als auch bezüglich der Modulation des nukleären Nrf2-Gehalts kein Hinweis auf eine Induktion von oxidativem Stress durch dieses Nanomaterials gefunden werden konnte. Des Weiteren ist eine ROS-bedingte Oxidation von GSH mit der Bildung von GSSG verbunden. Wenngleich der GSSG-Gehalt in HT29-Zellen aus in Abschnitt 4.1.4.4 genannten Gründen nicht erfasst werden konnte, ist in Anbetracht dessen, dass im GSH-Assay nach Tietze der zelluläre Gesamt-GSH-Gehalt (GSH + GSSG) bestimmt wird, davon auszugehen, dass dieser im Fall einer ROS-vermittelten Depletion des Antioxidans nahezu konstant bleibt (siehe Abschnitt 5.11.2). Daher spricht ein Absinken des tGSH-Spiegels in diesem Kontext zusätzlich gegen einen oxidativen Mechanismus. Eine mögliche Erklärung für die Depletion des tGSH-Gehalts sind GSH-Konjugationsprozesse. Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 erläutert, ist es denkbar, dass aufgrund der Cl^- -Konzentrationen im Zellkulturmedium durch Absenkung des elektrochemischen Normalpotentials lösliche Pt-Spezies entstehen, die daraufhin zur Erniedrigung des tGSH-Gehalts beitragen [Holleman und Wiberg, 1995]. Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.3 zum intestinalen Transport von Pt-Partikeln eines Durchmessers < 20 nm deuten auf die Bildung löslicher Pt-Spezies hin (siehe Abb. 4.44). Allerdings war dort eine konzentrationsabhängige Erhöhung des Pt-Gehalts im Überstand des Zellkulturmediums zu beobachten, während sich der tGSH-Gehalt bis zu einer Konzentration von 100 ng/cm^2 ($\hat{=}$ 580 ng/ml bzw. 2973 nM) verminderte und mit zunehmender Partikeldichte wieder anstieg. Da

diese Ergebnisse hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit nicht miteinander übereinstimmen und zudem unklar ist, inwieweit lösliche Pt-Spezies internalisiert werden, müssen zur Verifizierung dieser Hypothese noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Des Weiteren ist es vorstellbar, dass aus im Zellkulturmedium gebildeten Chloroplatinaten [Artelt et al., 1999] ungeladene Pt-Komplexe entstehen könnten, die, ähnlich der Wirkung von Cis-Pt, nach ihrer zellulären Aufnahme mit GSH interagieren [Petrovi et al., 2007]. Eine weitere Erklärung der GSH-depletierenden Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Pt-Partikel liegt in der Adsorption von GSH-Molekülen an die Partikeloberfläche. Wenngleich eine derartige Interaktion bislang noch nicht nachgewiesen wurde, ist aus Studien zu Automobilkatalysatoren bekannt, dass schwefelhaltige Moleküle, wie Thiole, eine hohe Affinität zu metallischem Pt aufweisen [Rodriguez und Hrbek, 1999; Rufael et al., 1992]. Daher wäre es möglich, dass GSH aufgrund der Thiolgruppe der Cystein-Komponente des Tripeptids eine vergleichbare Affinität gegenüber Pt⁰ besitzt. Diese Hypothese muss jedoch anhand weiterer Untersuchungen überprüft werden. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre eine Bestimmung des Pt-GSH-Gehalts nach Proteinisolierung mittels ICP-MS oder Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) [Zeller, 2004].

Insgesamt kann gesagt werden, dass Pt-Partikel eines Durchmessers < 100 nm und < 20 nm zu einer Verringerung des tGSH-Gehalts in HT29-Zellen führten, wobei sich die beobachteten Effekte mit abnehmendem Partikeldurchmesser und zunehmender Expositionsdauer verstärkt haben. Es liegt nahe, dass der dieser Beobachtung zugrunde liegende Mechanismus nicht auf die Generierung von ROS zurückzuführen ist. Jedoch ist eine Adsorption von GSH an die Oberfläche der Pt-Partikel denkbar.

4.2.6 Genotoxisches Potential von Pt-Partikeln

Zur Beurteilung des genotoxischen Potentials der in dieser Arbeit untersuchten Pt-Präparationen wurden diese im Hinblick auf DNA-strangbrechende Eigenschaften im Comet Assay an HT29-Zellen untersucht. Diese Untersuchungen wurden durch den Einsatz des DNA-Reparaturenzyms FPG ergänzt, um oxidative DNA-Schäden oder sog. FPG-sensitive Stellen zu erfassen und damit ein umfassenderes Bild über die Art des genetischen Schadens zu gewinnen. Darauf aufbauend sollte als weiterer Hinweis auf ein genotoxisches Potential zudem festgestellt werden, ob eine Exposition gegenüber Pt-NP zu einer direkten Wechselwirkung dieses Nanomaterials mit der DNA führt.

4.2.6.1 DNA-strangbrechende Eigenschaften von Pt-Partikeln

Die DNA-strangbrechenden Eigenschaften der Pt-Präparationen in HT29-Zellen wurden mittels Comet Assay unter alkalischen Elektrophoresebedingungen mit zusätzlicher FPG-Behandlung untersucht (siehe auch Abschnitt 4.1.5.1). Als Auswerteparameter für die DNA-strangbrechende Wirkung der Testsubstanz wurde die sog. Schweifintensität („tailintensity“) herangezogen (siehe auch Abschnitt 4.1.5.1).

Der Comet Assay wurde analog zum GSH-Assay nach 3- und 24-stündiger Inkubation durchgeführt, um den Einfluss der Expositionsdauer zu erfassen. Zur grafischen Darstellung der DNA-strangbrechenden Wirkung wurden jeweils die prozentualen Schweifintensitäten der einzelnen Proben (ohne und mit FPG-Behandlung) gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde für beide Inkubationszeiträume der Redoxcyclus Menadion (MEN, 10 μ M) eingesetzt. Die in diesem Abschnitt dargestellten Grafen werden nach folgendem Schema erläutert: Für jeden Inkubationszeitraum werden zunächst die Effektverläufe der einzelnen Pt-Präparationen in absteigender Größe der darin enthaltenen Pt-Partikel ohne FPG-Behandlung der Zellen beschrieben. Im Anschluss folgt analog dazu die Beschreibung der Effektverläufe nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Reparaturenzym FPG. Nachfolgend werden die Wirkungen der einzelnen Pt-Präparationen mit und ohne FPG-Behandlung und abschließend die beobachteten Effekte in Abhängigkeit der Inkubationszeit miteinander verglichen. Die in den grafischen Darstellungen gezeigten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf einen Vergleich von FPG-unbehandelten und -behandelten Proben. Die für beide Inkubationszeiträume berechneten signifikanten Unterschiede zwischen den Schweifintensitäten Pt-behandelter Proben und der β -Cyclodextrin-Kontrolle, sind in den Tab. 4.3 und 4.4 aufgeführt. Abbildung 4.52 zeigt die Ergebnisse der 3-stündigen Inkubation von HT29-Zellen mit Pt-Partikeln der Durchmesser > 100 nm, < 100 nm und < 20 nm.

Wie aus Abb. 4.52 deutlich wird, liegen die Schweifintensitäten nach 3-stündiger Inkubation mit Pt-Partikeln eines Durchmessers > 100 nm in einem Konzentrationsbereich von 0,0001 - 0,001 ng/cm^2 bei $(0,8 \pm 0,2)$ % bzw. $(0,7 \pm 0,2)$ % und unterscheiden sich damit nicht von der für die Kontrolle β -CD gemessenen Schweifintensität $(0,8 \pm 0,2)$ %. Mit zunehmender Partikeldichte zeichnet sich eine leichte Zunahme der Schweifintensität bis zu einer Konzentration von 0,1 ng/cm^2 ab, welche im weiteren Konzentrationsverlauf wieder abnimmt. Jedoch ist über den gesamten Konzentrationsbereich (0,0001 - 1000 ng/cm^2) in Bezug zur β -CD-Kontrolle kein signifikanter Unterschied der Schweifintensitäten zu beobachten. Eine Inkubation mit Pt-Partikeln < 100 nm führt bereits ab einer Konzentration von 0,01 ng/cm^2 ($\hat{=}$ 0,04 ng/ml bzw. 0,2 nM) zu einer signifikant unterschiedlichen Schweifintensität im Vergleich zur β -CD-Kontrolle. Diese steigt bis zu einer Konzentration von 1 ng/cm^2 ($\hat{=}$ 4,3 ng/ml bzw. 21,9 nM) und erreicht dort mit einem Wert von $(3,6 \pm 1)$ % ihr Maximum. Eine weitere Zunahme der Partikeldichte ist mit einer Verminderung der DNA-strangbrechenden Wirkung verbunden. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000 ng/cm^2 nähert sich die Schweifintensität dem Niveau der Kontrolle, weist aber immer noch einen signifikanten Unterschied zu dieser auf. Nach Exposition der HT29-Zellen gegenüber der vornehmlich aus Pt-Partikeln eines Durchmessers < 20 nm bestehenden Pt-Präparation ist bereits ab einer Konzentration von 0,001 ng/cm^2 ($\hat{=}$ 0,004 ng/ml bzw. 0,02 nM) eine signifikante DNA-strangbrechende Wirkung zu beobachten, die sich mit ansteigender Partikeldichte verstärkt. Bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 erreicht diese Pt-Präparation mit einer Schweifintensität von $(4,3 \pm 0,7)$ % ihr Wirkmaximum und zeigt damit eine mit der durch die Positivkontrolle MEN hervorgerufene vergleichbare DNA-schädigende Wirkung $((4,4 \pm 0,6)$ %).

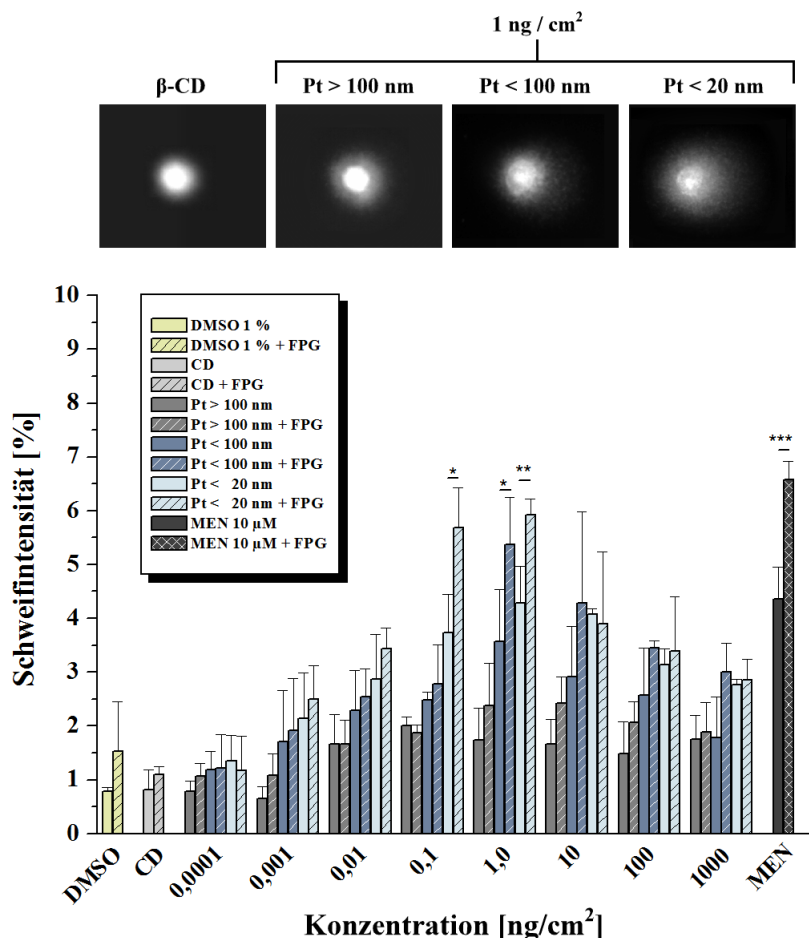


Abbildung 4.52: DNA-strangbrechende Wirkung von Pt-NP in HT29-Zellen nach 3-stündiger Inkubation in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers, bestimmt mittels Comet Assay unter alkalischen pH-Bedingungen. Oxidativ modifizierte Basen wurden durch Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) bestimmt (schraffierte Balken). Menadi-on (MEN, 20 μ M) diene als Positivkontrolle. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD nach Ausreißerbereinigung (Nalimov) von mind. vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für Pt-NP = β -Cyclodextrin (CD), Signifikanzbezug für MEN = DMSO 1 %) bzw. zwischen FPG-behandelten und -unbehandelten Proben wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). $1,0 \text{ ng/cm}^2 \hat{=} 4,3 \text{ ng/ml}$ bzw. $21,9 \text{ nM}$.

Im weiteren Konzentrationsverlauf ist wiederum ein Rückgang der DNA-schädigenden Wirkung zu verzeichnen, wobei auch hier in der höchsten getesteten Konzentration (1000 ng/cm^2) kein „no effect level“ erreicht wird. Insgesamt betrachtet, weisen alle Pt-Präparationen einen ähnlichen Effektverlauf auf, wenngleich dieser in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers unterschiedlich stark ausgeprägt ist: So erhöht sich das Wirkmaximum mit abnehmender Partikelgröße.

Nach Behandlung der mit Pt-Partikeln $> 100 \text{ nm}$ inkubierten Zellen mit dem DNA-Reparaturenzym FPG ist zwar über den gesamten Konzentrationsbereich eine leichte Erhöhung der Schweifintensitäten im Vergleich zu der FPG-behandelten β -CD-Kontrolle sowie den FPG-unbehandelten Proben festzustellen, die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. Eine FPG-Be-

Tabelle 4.3: Übersicht über signifikante Unterschiede der Schweifintensitäten der mit den einzelnen Pt-Präparationen behandelten Proben in Bezug zur Schweifintensität der β -Cyclodextrin-Kontrolle nach 3-stündiger Expositionsdauer (jeweils mit und ohne FPG-Behandlung), berechnet mittels Student's t -Test. $1,0 \text{ ng/cm}^2 \hat{=} 4,3 \text{ ng/ml}$ bzw. $21,9 \text{ nM}$.

Konz. [ng/cm ²]	3 h Inkubation					
	ohne FPG			mit FPG		
	Pt > 100 nm	Pt < 100 nm	Pt < 20 nm	Pt > 100 nm	Pt < 100 nm	Pt < 20 nm
0,0001	-	-	-	-	-	-
0,001	-	-	*	-	-	**
0,01	-	*	**	-	***	***
0,1	-	***	***	-	***	***
1,0	-	***	***	-	***	***
10	-	***	***	-	***	***
100	-	***	***	-	***	***
1000	-	*	**	-	***	***
MEN	***			***		

handlung der gegenüber Pt-Partikeln eines Durchmessers $< 100 \text{ nm}$ exponierten Zellen führt ebenfalls im gesamten Konzentrationsbereich zu einer Erhöhung der Schweifintensität gegenüber der FPG-behandelten β -CD-Kontrolle. Statistische Signifikanz wird dabei ab einer Konzentration von $0,01 \text{ ng/cm}^2$ ($\hat{=} 0,04 \text{ ng/ml}$ bzw. $0,2 \text{ nM}$) erreicht. Mit zunehmender Konzentration ist ein den FPG-unbehandelten Proben vergleichbarer Kurvenverlauf zu beobachten, derart dass bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 mit einer Schweifintensität von $(5,4 \pm 0,9) \%$ das maximale Wirkpotential erreicht wird, während sich die Schweifintensitäten im weiteren Konzentrationsverlauf wieder vermindern. Ein Vergleich der Schweifintensitäten zwischen FPG-unbehandelten und -behandelten Proben zeigt, dass sich diese im unteren Konzentrationsbereich ($0,0001 - 0,1 \text{ ng/cm}^2$) nicht deutlich voneinander unterscheiden. Ab einer Partikeldichte von 1 ng/cm^2 steigen die Schweifintensitäten der FPG-behandelten gegenüber den FPG-unbehandelten Proben deutlich an. Ein signifikanter Unterschied besteht allerdings lediglich bei der Partikeldichte mit der stärksten DNA-strangbrechenden Wirkung (1 ng/cm^2). Für die mit Pt-Partikeln $< 20 \text{ nm}$ inkubierten Zellen ist nach deren Behandlung mit FPG bereits ab einer Konzentration von $0,001 \text{ ng/cm}^2$ eine im Vergleich zur mit β -CD und FPG-behandelten Probe signifikante Erhöhung der Schweifintensität festzustellen. Mit zunehmender Partikeldichte ist ein bereits für die FPG-unbehandelten Proben beschriebener Effektverlauf mit dem Wirkmaximum bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 zu erkennen. Signifikante Unterschiede zwischen FPG-behandelten und-unbehandelten Proben werden in einem Konzentrationsbereich von $0,1 - 1 \text{ ng/cm}^2$ erreicht. Auch die mit der Positivkontrolle inkubierten Zellen zeigen nach FPG-Behandlung eine signifikant erhöhte DNA-Schädigung ($(6,6 \pm 0,3) \%$ gegenüber $(4,4 \pm 0,6) \%$).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass nach 3-stündiger Expositionsdauer lediglich Pt-Partikel mit Durchmessern von < 20 nm und < 100 nm eine deutliche DNA-strangbrechende Wirkung in HT29-Zellen aufweisen. Dabei ist für beide Pt-Präparationen sowohl mit als auch ohne FPG-Behandlung der Zellen ein vergleichbarer Effektverlauf mit einem Wirkmaximum bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 zu erkennen. Der Unterschied der DNA-Strangbruchrate zwischen FPG-behandelten und -unbehandelten Proben ist bei der Pt-Präparation mit Pt-Partikeln < 100 nm bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 und bei der Pt-Präparation mit Pt-Partikeln < 20 nm in einem Konzentrationsbereich von $0,1 - 1 \text{ ng/cm}^2$ statistisch signifikant, was auf eine oxidative Schädigung der DNA bzw. FPG-sensitive Stellen hindeutet. Hervorzuheben ist, dass die stärkste DNA-strangbrechende Wirkung durch die Pt-Partikel mit dem kleinsten Durchmesser (< 20 nm) erreicht wird.

Nach einer 24-stündigen Inkubation von HT29-Zellen zeigt sich für alle Pt-Präparationen der bereits nach 3-stündiger Expositionsdauer festgestellte Wirkverlauf mit einer maximalen DNA-Strangbruchrate bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 (siehe Abb. 4.53).

Dieser ist analog zur 3-stündigen Inkubation in Abhängigkeit vom Durchmesser der untersuchten Pt-Partikel unterschiedlich stark ausgeprägt. Pt-Partikel > 100 nm zeigen nach 24-stündiger Expositionsdauer über den gesamten Konzentrationsbereich ($0,0001 - 1000 \text{ ng/cm}^2$) eine marginale DNA-strangbrechende Wirkung, wobei im Konzentrationsbereich von $1 - 100 \text{ ng/cm}^2$ statistische Signifikanz erreicht wird. Die Pt-Präparation, die vorwiegend Pt-Partikel eines Durchmessers < 100 nm enthält, führt indes ab einer Konzentration von $0,01 \text{ ng/cm}^2$ zu einer signifikanten Erhöhung der Schweifintensität im Vergleich zur β -CD-Kontrolle. Diese erreicht bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 mit $(5,4 \pm 0,7) \%$ ihren höchsten Wert. Mit zunehmender Partikeldichte vermindert sich die DNA-Strangbruchrate wieder. Nach Inkubation der Zellen mit Pt-Partikeln < 20 nm ist ab einer Konzentration von $0,001 \text{ ng/cm}^2$ eine im Vergleich zur β -CD-Kontrolle signifikante DNA-strangbrechende Wirkung festzustellen. Mit Zunahme der Partikeldichte kommt es bis zu einer Konzentration von 1 ng/cm^2 zu einem Anstieg der DNA-Strangbruchrate auf einen maximalen Wert von $(6 \pm 0,6) \%$. In höheren Konzentrationen ist indes ein Rückgang der Schweifintensität zu beobachten, der nicht konzentrationsabhängig verläuft. Damit korreliert auch nach 24-stündiger Expositionsdauer die DNA-strangbrechende Wirkung invers mit dem Durchmesser der Pt-Partikel.

Eine FPG-Behandlung der mit Pt-Partikeln eines Durchmessers > 100 nm inkubierten Zellen führt in einem Konzentrationsbereich von $1 - 100 \text{ ng/cm}^2$ zu einer signifikanten Erhöhung der Schweifintensität in Bezug zur Wirkung der FPG-behandelten β -CD-Kontrolle, jedoch ist kein signifikanter Unterschied zwischen FPG-behandelten und -unbehandelten Proben zu beobachten. Nach Behandlung der mit Pt-Partikeln < 100 nm inkubierten Zellen mit dem Reparaturenzym ist ab einer Konzentration von $0,1 \text{ ng/cm}^2$ eine im Vergleich zur FPG-behandelten Kontrolle signifikante Zunahme der DNA-Strangbruchrate zu verzeichnen. In der nächst höheren getesteten Konzentration (1 ng/cm^2) erlangt diese Pt-Präparation mit einer Schweifintensität von $(7,2 \pm 1) \%$ ihre stärkste Wirkung, die mit zunehmender Partikeldichte abnimmt.

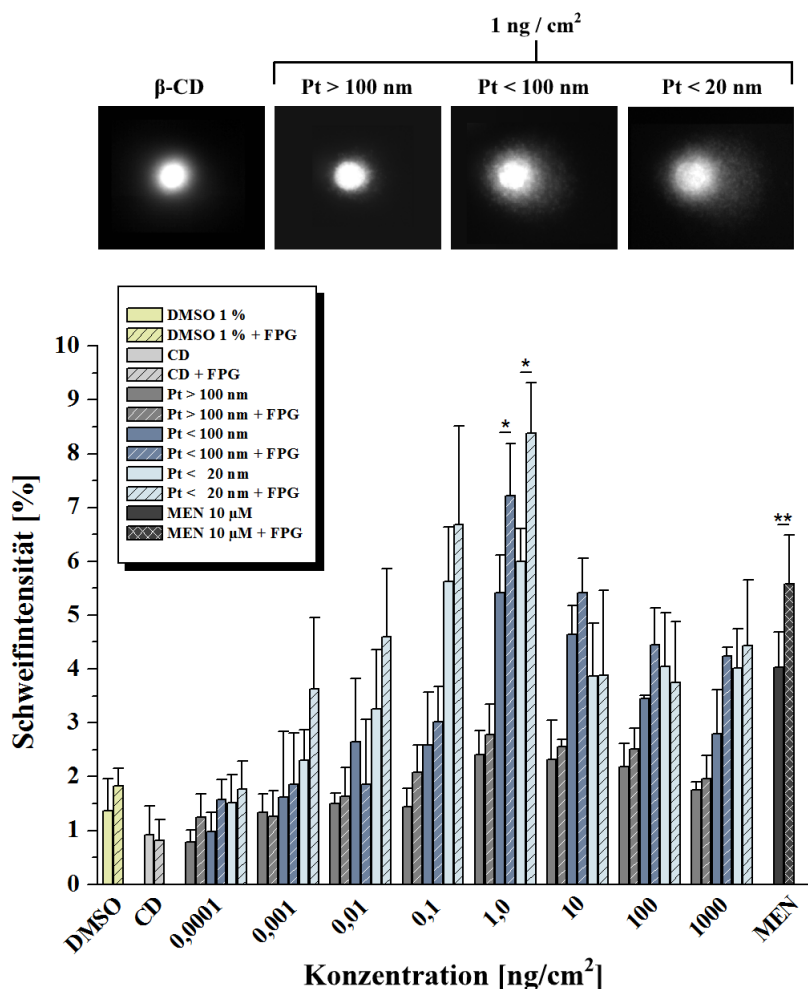


Abbildung 4.53: DNA-strangbrechende Wirkung von von Pt-NP in HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers, bestimmt mittels Comet Assay unter alkalischen pH-Bedingungen. Oxidativ modifizierte Basen wurden durch Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) bestimmt (schraffierte Balken). Menadion (MEN, 20 μ M) diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD nach Ausreißerbereinigung (Nalimov) von mind. vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede der Proben zur jeweiligen Kontrolle (Signifikanzbezug für Pt-NP = β -Cyclodextrin (CD), Signifikanzbezug für MEN = DMSO 1 %) bzw. zwischen FPG-behandelten und -unbehandelten Proben wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). $1,0 \text{ ng/cm}^2 \hat{=} 4,3 \text{ ng/ml}$ bzw. $21,9 \text{ nM}$.

Bei einem Vergleich der FPG-unbehandelten mit den -behandelten Proben zeigt sich jedoch lediglich bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 ein signifikanter Unterschied. Für mit Pt-Partikeln eines Durchmessers $< 20 \text{ nm}$ inkubierten Zellen ist nach FPG-Behandlung ebenfalls eine signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zur FPG-behandelten β -CD-Kontrolle zu erkennen. Diese setzt bei einer Konzentration von $0,001 \text{ ng/cm}^2$ ein und steigt bis 1 ng/cm^2 Partikeldichte auf das Maximum von $(8,4 \pm 0,9) \%$ an. Bei weiterer Erhöhung der Partikeldichte ist wiederum ein Absinken der Schweifintensität festzustellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen FPG-behandelten und- unbehandelten Proben wird analog zu Pt-Partikeln $< 100 \text{ nm}$ bei

einer Partikeldichte von 1 ng/cm² erreicht.

Tabelle 4.4: Übersicht über signifikante Unterschiede der Schweifintensitäten der mit den einzelnen Pt-Präparationen behandelten Proben in Bezug zur Schweifintensität der β -Cyclodextrin-Kontrolle nach 24-stündiger Expositionsdauer (jeweils mit und ohne FPG-Behandlung), berechnet mittels Student's *t*-Test. 1,0 ng/cm² $\hat{=}$ 4,3 ng/ml bzw. 21,9 nM.

Konz. [ng/cm ²]	24 h Inkubation					
	ohne FPG			mit FPG		
	Pt > 100 nm	Pt < 100 nm	Pt < 20 nm	Pt > 100 nm	Pt < 100 nm	Pt < 20 nm
0,0001	-	-	-	-	-	-
0,001	-	-	*	-	-	**
0,01	-	*	**	-	-	***
0,1	-	**	***	-	***	***
1,0	**	***	***	**	***	***
10	**	***	***	**	***	***
100	**	***	***	**	***	***
1000	-	**	**	-	***	***
MEN		***			***	

Insgesamt betrachtet, zeigt sich nach einer 24-stündigen Inkubation im Gegensatz zu den Ergebnissen der 3-stündigen Inkubation für alle Pt-Präparationen (Pt > 100 nm, Pt < 100 nm und Pt < 20 nm) eine DNA-strangbrechende Wirkung in HT29-Zellen. Jedoch ist der Wirkungsbereich der Pt-Partikel eines Durchmessers > 100 nm gegenüber den für Pt-Partikel < 100 nm und < 20 nm beobachteten Wirkungsbereichen deutlich vermindert (1 - 100 ng/cm² gegenüber 0,01 - 1000 ng/cm² (Pt < 100 nm) bzw. 0,001 - 1000 ng/cm² (Pt < 20 nm)). In Übereinstimmung mit der 3-stündigen Expositionsdauer ist bei einer Konzentration von 1 ng/cm² ($\hat{=}$ 4,3 ng/ml bzw. 21,9 nM) das höchste genotoxische Potential der Pt-Präparationen festzustellen. Auch hinsichtlich der Korrelation zwischen DNA-strangbrechender Wirkung und Partikeldurchmesser stimmen die Ergebnisse beider Inkubationszeiträume überein. Bezüglich der DNA-Strangbruchrate nach Behandlung der Proben mit dem DNA-Reparaturenzym FPG ist für die Pt-Partikel < 100 nm und < 20 nm analog zur 3-stündigen Inkubation bei einer Konzentration von 1 ng/cm² eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den FPG-unbehandelten Proben zu erkennen. Im Gegensatz zur 3-stündigen Inkubation ist dieser Unterschied jedoch generell weniger stark ausgeprägt, so dass für Pt-Partikel < 20 nm nach einer Expositionsdauer von 24 h lediglich bei einer Partikeldichte von 1 ng/cm², gegenüber einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 ng/cm² nach 3-stündiger Inkubation, statistische Signifikanz erreicht wird. Insgesamt betrachtet steigt die DNA-strangbrechende Wirkung der Pt-Präparationen mit zunehmender Inkubationsdauer an, dabei ist für Pt-Partikel der Durchmesser < 100 nm und < 20 nm in einem Konzentrationsbereich von 1 - 100 ng/cm² bzw. 0,1 - 100 ng/cm² ein signifikanter Unterschied der Schweifintensitäten im Vergleich zur

3-stündigen Inkubation festzustellen (siehe Tab. 4.5).

Dass die nach 3-stündiger wie auch nach 24-stündiger Expositionsdauer beobachtete DNA-Schädigung nicht auf eine Beeinflussung der Viabilität der untersuchten Zellen zurückzuführen ist, zeigen parallel durchgeführte Viabilitätsbestimmungen mittels Trypanblau-Ausschluss (siehe Abschnitt 5.10.1). Die Viabilitäten der HT29-Zellen nach deren Behandlung mit den einzelnen Pt-Präparationen wie auch mit der Positivkontrolle lagen nach beiden Inkubationszeiträumen stets über 80 % und damit im Bereich der zugehörigen Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.5: Signifikante Unterschiede zwischen den nach 3- und 24-stündiger Expositionsdauer ermittelten Schweifintensitäten der mit den einzelnen Pt-Präparationen behandelten Proben (jeweils zwischen den FPG-behandelten Proben bestimmt), berechnet mittels Student's *t*-Test. $1,0 \text{ ng/cm}^2 \hat{=} 4,3 \text{ ng/ml}$ bzw. $21,9 \text{ nM}$.

Konz. [ng/cm ²]	3 h / 24 h Inkubation		
	Pt > 100 nm	Pt < 100 nm	Pt < 20 nm
0,0001	-	-	-
0,001	-	-	-
0,01	-	-	-
0,1	-	-	*
1,0	-	*	**
10	-	*	*
100	-	*	*
1000	-	-	-

4.2.6.2 Direkte Wechselwirkung von Pt mit der DNA

Um die DNA-strangbrechende Wirkung von Pt-Partikeln näher zu charakterisieren, wurde nachfolgend anhand der im Comet Assay wirksamsten Pt-Präparation (Pt < 20 nm) untersucht, ob dieses nanoskalige Metall nach Inkubation von HT29-Zellen zur DNA gelangt und damit die Möglichkeit einer direkten Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten besteht. Hierzu wurde im Anschluss an die Partikelinkubation die DNA der Zellen mithilfe des DNeasy Quantification Kit (Qiagen) isoliert. Nachfolgend wurde der DNA-Gehalt der Proben fotometrisch bestimmt, die Proben im Anschluss verascht und die jeweiligen Pt-Gehalte mittels ICP-MS bestimmt. Die ICP-MS-Bestimmungen wurden von Dr. Ch. Hartinger (Institut für Anorganische Chemie, Universität Wien) durchgeführt. Um, analog zu den vorangegangenen Untersuchungen, einen Einfluss der Expositionsdauer auf die beobachteten Effekte zu ermitteln und zudem aus einer Partikel-Kontamination während der Zellpräparation resultierende artifizielle Ergebnisse auszuschließen, wurden verschiedene Inkubationszeiträume gewählt.

Abbildung 4.54 zeigt die Ergebnisse der Inkubation von HT29-Zellen mit Pt-Partikeln < 20 nm über die Zeiträume 1, 4 und 24 h. Für die grafische Darstellung wurde der Pt-Gehalt der

Proben auf den jeweiligen DNA-Gehalt normiert und als fmol Pt pro 1 μg DNA gegen die getesteten Konzentrationen aufgetragen. Cis-Platin (Cis-Diammindichloroplatin(II), Cis-Pt), 10 μM ; siehe Abb. 4.55 und Abschnitt 2.9.4.2), das aufgrund seiner DNA-bindenden Eigenschaften weit verbreitet als Zytostatikum eingesetzt wird, diente als Positivkontrolle.

Eine Exposition von HT29-Zellen gegenüber Cis-Pt (10 μM) führt zu einem mit der Inkubationszeit zunehmenden Pt-Gehalt der DNA. Dabei ist bereits nach einer 1-stündigen Inkubation ein Pt-DNA-Gehalt von etwa $(12,5 \pm 2,8)$ fmol Pt/ μg DNA festzustellen, welcher sich nach einer Expositionsdauer von 24 h nahezu verdoppelt ($(25 \pm 9,9)$ fmol Pt/ μg DNA). Die Pt-DNA-Gehalte der Kontrollen (β -CD und Medium 10 % FKS) liegen unabhängig von der Inkubationszeit

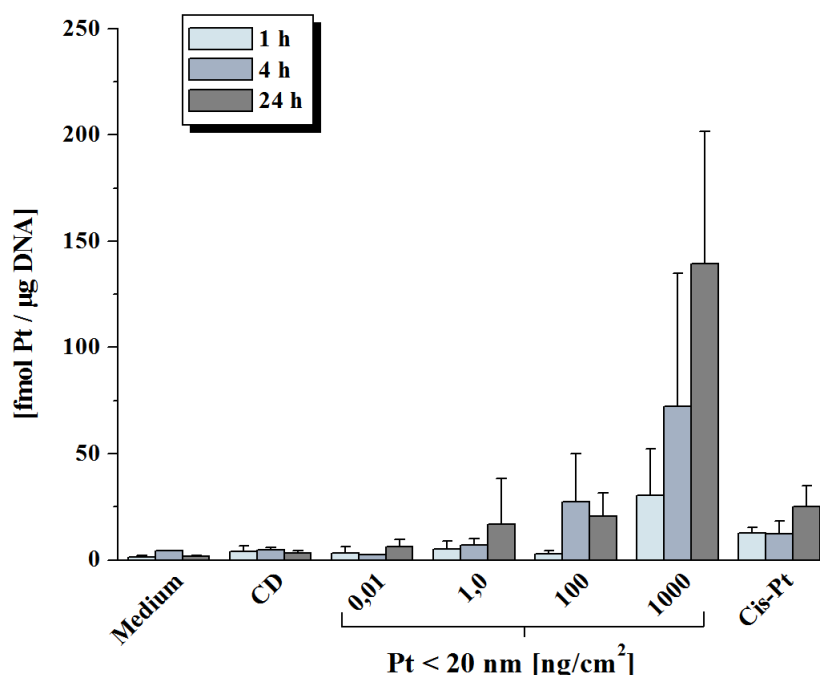


Abbildung 4.54: DNA-Platinierung nach Inkubation von HT29-Zellen mit Pt-Partikeln eines Durchmessers < 20 nm über die Zeiträume 1, 4 und 24 h, bestimmt mittels ICP-MS (in Zusammenarbeit mit H. Gehrke). Cisplatin (Cis-Pt, 10 μM) diente als Positivkontrolle. β -Cyclodextrin (CD) und Medium (10 % FKS) wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD von mind. drei unabhängigen Versuchen. $1,0 \text{ ng}/\text{cm}^2 \hat{=} 7,6 \text{ ng}/\text{ml}$ bzw. $38,9 \text{ nM}$.

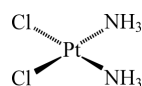


Abbildung 4.55: Struktur von Cis-Diammindichloroplatin(II) (Cis-Pt).

in einem Bereich von 1,4 - 4,5 fmol Pt/ μg DNA, wobei bei etwa 1,5 fmol Pt/ μg DNA bereits die Nachweisgrenze erreicht ist und dieser Wert somit als Hintergrund zu werten ist. Der Pt-DNA-Gehalt der mit Pt-Partikeln inkubierten Zellen steigt mit zunehmender Konzentration und Expositionsdauer an. Nach einer Inkubationszeit von 1 h ist in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 ng/cm^2 kein signifikanter Unterschied zwischen den Pt-DNA-Gehalten Pt-behandelter Proben und des Pt-DNA-Gehalts der Kontrolle β -CD zu erkennen. Bei der höch-

sten getesteten Konzentration zeigt sich mit einem Pt-DNA-Gehalt von 31 fmol Pt/ μ g DNA im Vergleich zur Kontrolle jedoch ein deutlicher Anstieg. Nach Verlängerung der Expositionsdauer auf 4 h sind im unteren Konzentrationsbereich (0,01 - 1 ng/cm²) zur 1-stündigen Inkubationsdauer vergleichbare Pt-Gehalte der DNA festzustellen.

Bei einer Konzentration von 100 ng/cm² ($\hat{=}$ 760 ng/ml bzw. 3.895 nM) ist, verglichen mit der 1-stündigen Expositionsdauer, nach 4 h indes eine deutliche Erhöhung des Pt-DNA-Gehalts zu verzeichnen ((27,5 $\pm$ 22,5) fmol Pt/ μ g DNA), die bei der höchsten getesteten Konzentration mit einem Wert von (72 $\pm$ 63) fmol Pt/ μ g DNA ein Maximum erreicht. Eine 24-stündige Expositionsdauer führt bereits ab einer Konzentration von 1 ng/cm² ($\hat{=}$ 7,6 ng/ml bzw. 39 nM) zu einem Anstieg des Pt-DNA-Gehalts, welcher ebenfalls konzentrationsabhängig zunimmt und bei einer Konzentration von 1000 ng/cm² einen maximalen Wert von (139 $\pm$ 62) fmol Pt/ μ g DNA erreicht.

4.2.6.3 Zusammenfassung und Diskussion zum genotoxischen Potential von Pt-Partikeln unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pt-Partikel der Durchmesser > 100 nm, Pt < 100 nm und Pt < 20 nm zeigten eine DNA-strangbrechende Wirkung in HT29-Zellen, die in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers und der Expositionsdauer unterschiedlich stark ausgeprägt war. So war für Pt-Partikel der Durchmesser < 100 nm und < 20 nm bereits nach 3-stündiger Expositionsdauer eine deutliche Erhöhung der DNA-Strangbruchrate gegenüber der β -CD-Kontrolle festzustellen, während Pt-Partikel > 100 nm eine marginale Beeinflussung der DNA-Integrität aufwiesen (siehe Abb. 4.52). Die stärkste DNA-Schädigung wurde von den Pt-Partikeln mit dem kleinsten Durchmesser (Pt < 20 nm) bewirkt. Die DNA-schädigenden Eigenschaften nahmen mit ansteigender Expositionsdauer zu, so dass nach 24-stündiger Inkubationszeit auch Pt-Partikel eines Durchmessers > 100 nm zu einer gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhten DNA-Strangbruchrate führten (siehe Abb. 4.53). Dies könnte zum Einen darin begründet sein, dass diese Pt-Präparation vornehmlich aus Pt-Agglomeraten (siehe Abschnitt 4.2.1.1) bestand und diese aufgrund ihrer im Vergleich zu kleineren Partikeln geringeren Oberflächenreaktivität ihre Wirkung erst nach längerer Expositionsdauer entfalten. Zum Anderen könnte die zelluläre Aufnahme von Pt-Agglomeraten durch einen anderen, gar langsameren Mechanismus erfolgt sein, was ebenfalls zu einer mit der Inkubationszeit zunehmenden Effektivität führen würde. So berichten Asharani et al. [2010] von einer passiven Aufnahme (Diffusion) von Pt-Partikeln eines Durchmessers von 5 - 8 nm, während die Internalisierung von 0,2 - 1,6 μ m großen Pt-Partikeln laut Zeller [2004] über phagozytotische Vorgänge erfolgt. Die Annahme spiegelt sich in einem gegenüber den für Pt-Partikel < 100 nm und < 20 nm beobachteten Wirkungsbereichen deutlich verminderten Wirkfenster dieser Pt-Partikel wider (1 - 100 ng/cm² gegenüber 0,001 - 1000 ng/cm² (Pt < 100 nm) bzw. 0,01 - 1000 ng/cm² (Pt < 20 nm)). Dabei korrelierte ebenfalls nach 24-stündiger Expositionsdauer die DNA-schädigende Wirkung invers mit dem Partikeldurchmesser, so dass sich die kleinsten Partikel (Pt < 20 nm) als die wirksamsten herausstellten. Des Weiteren war sowohl nach 3- als auch 24-stündiger Expositionsdauer ein vergleichbarer Effektverlauf zu

beobachten, derart dass die DNA-strangbrechende Wirkung bis zu einer Konzentration von 1 ng/cm² zunahm und sich im weiteren Konzentrationsverlauf wieder verminderte. Folglich war nach beiden Inkubationszeiträumen bei einer Konzentration von 1 ng/cm² ($\hat{=}$ 4,3 ng/ml bzw. 21,9 nM) das höchste genotoxische Potential der Pt-Präparationen festzustellen. Bezüglich der DNA-Strangbruchrate nach Behandlung der Proben mit dem DNA-Reparaturenzym FPG war für die Pt-Partikel < 100 nm und < 20 nm nach beiden Inkubationszeiträumen bei einer Konzentration von 1 ng/cm² eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den FPG-unbehandelten Proben zu erkennen. Jedoch war der Unterschied der DNA-Strangbruchrate zwischen FPG-behandelten und FPG-unbehandelten Proben mit zunehmender Inkubationsdauer vermindert, wobei für die FPG-behandelten Proben zu beachten ist, dass die Schwankungsbreiten nach 24-stündiger Inkubation im Vergleich zur 3-stündigen Inkubation vereinzelt vergrößert sind.

Insgesamt betrachtet stimmen die Ergebnisse zur DNA-strangbrechenden Wirkung mit denen zur Modulation des zellulären tGSH-Gehalts hinsichtlich mehrerer Gesichtspunkte überein: Der Korrelation zwischen Partikeldurchmesser und Ausprägung der beobachteten Effekte, der Verstärkung der Wirkung mit zunehmender Expositionsdauer sowie des Effektverlaufs. So ist die höchste DNA-Strangbruchrate in dem Konzentrationsbereich zu sehen, in dem auch die stärkste Erniedrigung des zellulären tGSH-Gehalts zu beobachten ist, wobei in beiden Fällen die Pt-Partikel mit dem kleinsten Durchmesser die größte Wirksamkeit aufweisen. Demnach können bezüglich der Wirkung der Pt-Partikel und des Wirkfensters vergleichbare Überlegungen angestellt werden, derart dass Partikel eines größeren Durchmessers (hierbei ist die in hohen Konzentrationen vermutete Partikelagglomeration mit einbezogen) aufgrund einer kleineren spezifischen Oberfläche eine verminderte Reaktivität und Zellgängigkeit aufweisen (siehe Abschnitt 4.2.5.4). In Anbetracht der beobachteten Analogien ist ein Beitrag der tGSH-Depletion zur DNA-strangbrechenden Wirkung denkbar. So ist GSH zum Einen nachweislich an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt [Mehta und Siddik, 2009], womit eine Senkung des zellulären tGSH-Gehalts aufgrund einer beeinträchtigten Reparatur der DNA eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate zur Folge hätte. Zum Anderen führt eine verminderte antioxidative Kapazität der Zelle zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber elektrophilen Spezies, wie ROS. Dabei ist nicht nur eine substanzvermittelte Generierung von ROS zu berücksichtigen, sondern auch eine Verschiebung des physiologischen Redoxgleichgewichts zugunsten von Prooxidantien, welche daraufhin nukleophile Moleküle, wie die DNA, schädigen können. Da für Pt-Partikel eines Durchmessers < 100 nm und < 20 nm in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 ng/cm² ($\hat{=}$ 0,4 - 4,3 ng/ml bzw. 2,2 - 21,9 nM) eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nach Behandlung der Zellen mit FPG festgestellt wurde, kann ein oxidativer Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Jedoch erscheint letztere Möglichkeit aufgrund der negativen Ergebnisse des DCF-Assays sowie einer ausbleibenden Beeinflussung des nukleären Nrf2-Gehalts unwahrscheinlich. Zudem werden durch FPG neben oxidativ modifizierten DNA-Basen, wie 8-Oxo-Guanin oder 8-Oxo-Adenin [Chetsanga et al., 1982; Boiteux et al., 1990; 1992] auch weitere Läsionen der DNA, wie DNA-Addukte, erkannt (siehe Abschnitt 2.7.1). Nicht zuletzt setzte die DNA-strangbrechende Wirkung bereits bei Konzentrationen ein, in denen kein Einfluss auf den zellulären tGSH-Gehalt zu beobachten war. Aus den genannten

Gründen scheint neben der tGSH-Depletion ein weiterer Mechanismus zur DNA-schädigenden Wirkung der Pt-Partikel beizutragen. Eine Möglichkeit wäre eine direkte Interaktion von Pt mit der DNA in Form von elektrostatischen Wechselwirkungen oder einer kovalenten Bindung von Metallkationen mit dem negativ geladenen DNA-Rückgrat [Clarke et al., 1999]. Einen Hinweis darauf gibt, wie oben erläutert, unter Berücksichtigung der negativen Ergebnisse im DCF-Assay und der ausbleibenden Beeinflussung des nukleären Nrf2-Gehalts, die Erhöhung der Schweifintensität nach Behandlung der Proben mit FPG. Vor diesem Hintergrund wurde exemplarisch für die Pt-Partikel mit der stärksten DNA-schädigenden Wirkung ($Pt < 20$ nm) untersucht, ob nach Inkubation von HT29-Zellen mit dieser Pt-Präparation eine DNA-Platinierung festzustellen ist. Hierzu wurde im Anschluss an die Partikelinkubation nach Zeiträumen von 1, 4 und 24 h die DNA der Zellen isoliert und deren Pt-Gehalt bestimmt (siehe Abb. 4.54). Mit zunehmender Partikeldichte war ein ansteigender Pt-Gehalt der DNA festzustellen, was auf eine direkte gegenseitige Beeinflussung der beiden Komponenten hindeutet. Jedoch entsprach die Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Platinierung nicht dem für die DNA-strangbrechende Wirkung beobachteten Wirkverlauf, da dort bei höherer Partikeldichte eine Abnahme der DNA-Strangbruchrate eintrat. Ein Grund für die konzentrationsabhängige Erhöhung des Pt-DNA-Gehalts könnte eine im experimentellen Ablauf erfolgte Kontamination der Proben mit Pt-Partikeln darstellen. Hierbei kommen zwei Ursachen in Frage: Zum Einen könnte eine Verschleppung der Pt-Partikel, trotz einer standardisierten Vorgehensweise, von einem unzureichenden Abwaschen der Partikel von den Zellen herrühren. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da sich aus der Durchführung der Untersuchungen in verschiedenen Inkubationszeiträumen eine mit verlängerter Expositionsdauer zunehmende DNA-Platinierung ergab. Würde die Kontamination der Proben aus dem beschriebenen systematischen Fehler resultieren, wären indes unabhängig von der Inkubationsdauer vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Pt-DNA-Gehalts zu erwarten. Zum Anderen wäre eine Verschleppung bereits internalisierter Pt-Partikel denkbar, was unter der Annahme einer mit der Expositionsdauer zunehmenden zellulären Aufnahme nanostrukturierter Materie die Ergebnisse erklären würde. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.3, die eine mit zunehmender Partikeldichte erhöhte Löslichkeit von Pt im Zellkulturmedium vermuten lassen. In Zusammenhang mit den Ergebnissen der DNA-Platinierung deutet dies auf eine von löslichen Pt-Spezies (vorwiegend Pt^{2+}) ausgehende Wechselwirkung mit der DNA hin. Jedoch kann von einer extrazellulär auftretenden Bildung löslicher Pt-Spezies nicht ohne weiteres auf eine DNA-Platinierung und daraus resultierende DNA-Schädigung geschlossen werden, zumal unklar ist, inwieweit Pt-Ionen die Zellmembran passieren. Alternativ besteht die Möglichkeit der Freisetzung von Pt^{2+} nach endozytotischer Aufnahme von Pt-Partikeln aufgrund des in Endosomen vorherrschenden sauren Milieus, was bereits für Ni nachgewiesen werden konnte [Abbraccio et al., 1982; Costa et al., 2005]. Von dieser Annahme geht u.a. A. Zeller [2004] aus, der in seiner Arbeit mittels ICP-MS eine konzentrations- und von der Inkubationszeit abhängige Bildung von Pt-DNA-Addukten nach Exposition von A549-Zellen gegenüber Pt-Partikeln eines Durchmessers von 0,2 - 1,6 μm nachweisen konnte. Dabei wurde analog zu dem in dieser Arbeit erlangten Ergebnis festgestellt, dass sich die genotoxische Wirkung der Pt-Partikel mit abnehmendem Partikeldurchmesser verstärkt. Um beurteilen zu können, ob die beobachteten

Effekte auf der Aufnahme bereits gelöster Pt-Spezies beruhen oder auf die Internalisierung von Pt-Partikeln zurückzuführen sind, wurden zusätzlich Untersuchungen zur DNA-Addukt-Bildung mit löslichem PtCl_4 sowie dem Zentrifugationsüberstand des Kulturmediums, welches gelöste Pt-Spezies der inkubierten Pt-Partikel enthielt, durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass die überwiegende Zahl der DNA-Addukte aus der zellulären Aufnahme der Pt-Partikel resultiert und nicht aus der Aufnahme bereits extrazellulär gelöster Spezies hervorgeht. Zudem konnte A. Zeller [2004] in Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung des Testmaterials eine Anreicherung endozytierter Pt-Partikel in Kernnähe sowie eine Zunahme des Pt-Gehalts von Zellkernproteinen feststellen. Dies führte ihn zu der Annahme, dass im Verlauf des endosomalen Transports lösliche Pt-Spezies entstehen (siehe oben), die nachfolgend in den Zellkern diffundieren und mit der DNA interagieren. Von einer ähnlichen Vermutung gehen Aharani et al. [2010] aus, die DNA-strangbrechende Eigenschaften von Pt-NP eines Durchmessers von 5 - 8 nm in U251- und IMR-90-Zellen in einem Konzentrationsbereich von (20 - 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$) feststellen konnten. Ab einer Konzentration von 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde zudem eine konzentrationsabhängige Generierung von H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet-}$ beobachtet, was die Bildung von löslichen Pt-Spezies infolge elektrochemischer Vorgänge begünstigt. Daher wurde in dieser Studie in Konzentrationen $\geq 80 \mu\text{g}/\text{ml}$ ein Beitrag von ROS an der DNA-schädigenden Wirkung der Pt-NP vermutet. Da durch die in dieser Arbeit untersuchten Pt-Partikel keine Bildung von ROS festgestellt werden konnte, kann ein derartiger Mechanismus zur Freisetzung löslicher Pt-Spezies weitestgehend ausgeschlossen werden.

Neben einer von löslichen Pt-Spezies ausgehenden Wirkung besteht die Möglichkeit einer Translokation von Pt-Partikeln in den Zellkern und eine daraus resultierende Beeinflussung der DNA oder nukleärer Strukturen, wie bspw. DNA-Reparaturenzymen, Histonen oder Topoisomerasen [Unfried et al., 2007].

Welche Art der Wechselwirkung bzw. welche Form von Pt für die DNA-schädigende Wirkung der untersuchten Pt-Präparationen verantwortlich ist und woraus die Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Platinierung resultiert, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Zur Beurteilung der erlangten Ergebnisse wäre es u.a. von entscheidender Relevanz, Aussagen darüber treffen zu können, in welcher Form Pt an die DNA assoziiert ist. Diese Fragestellung ergibt sich auch aufgrund der Beobachtung, dass für Pt-NP eine weitaus höhere DNA-Platinierung festgestellt werden konnte als für das Zytostatikum Cis-Pt, jedoch kein Einfluss auf die Viabilität der HT29-Zellen durch die Pt-NP zu beobachten war. Für Cis-Platin ist in der Literatur, abhängig von der eingesetzten Zelllinie, indes eine wachstumshemmende Wirkung in Konzentrationen beschrieben, welche die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von 10 μM vereinzelt deutlich unterschreiten (IC_{50} -Werte: 0,18 - 7,7 μM) [Johnson et al., 1997]. In Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Cis-Pt konnte eine selektive Bindung des daraus unter zellulären Bedingungen hervorgehenden Aquakomplexes an die exozyklischen N-Atome der Purinbasen Guanin und Adenin nachgewiesen werden. Auf den daraus resultierenden chemisch stabilen Interstrang- bzw. Intrastrangverknüpfungen [Ott und Gust, 2006; Voigt et al., 2006] und der damit einhergehenden Verzerrung der DNA-Geometrie basieren die zytotoxischen und mutagenen Eigenschaften von Cis-Pt [Cepeda et al., 2007; Jamieson und Lippard, 1999]. Untersuchungen hinsichtlich der

Art und Stabilität der in dieser Arbeit festgestellten Pt-DNA-Assoziation könnten somit Aufschluss darüber geben, inwieweit die ausbleibende Zytotoxizität der untersuchten Pt-NP auf ein von Cis-Pt abweichendes Verknüpfungsmuster zurückzuführen ist bzw. eine Verschleppung der Pt-Partikel im Aufarbeitungsprozess stattgefunden hat. Eine vielversprechende und äußerst sensitive Methode zur Erfassung von DNA-Addukten stellt u.a. das sog. ^{32}P -Postlabeling dar, durch das nach enzymatischer Hydrolyse der DNA, Adduktanreicherung sowie radioaktiver Markierung und elektrophoretischer bzw. chromatografischer Auftrennung der DNA-Addukte ein Addukt in 10^{10} Nukleotiden detektiert werden kann [Phillips und Arlt, 2007].

Insgesamt kann gesagt werden, dass die untersuchten Pt-Präparationen eine DNA-schädigende Wirkung aufwiesen, wobei sich die beobachteten Effekte mit abnehmendem Partikeldurchmesser und zunehmender Expositionsdauer verstärkt haben. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse liegt es nahe, dass der dieser Beobachtung zugrunde liegende Mechanismus nicht auf eine indirekte ROS-vermittelte Interaktion zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf einer direkten Wechselwirkung zwischen Pt und der DNA basiert. Ob das genotoxische Potential von extrazellulär gebildeten löslichen Pt-Spezies oder internalisiertem Pt^0 -NP ausgeht und in welcher Form Pt mit der DNA assoziiert ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.2.7 Zusammenfassung

Zur Bewertung einer von nanostrukturiertem Pt ausgehenden Wirkung auf den GIT wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob metallische Pt-Partikel von humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) internalisiert und als Resultat davon das Wachstum, der Redoxstatus sowie die DNA-Integrität der Zellen beeinflusst werden. Dabei sollte insbesondere eine mögliche Korrelation zwischen dem Partikeldurchmesser und der Zellantwort aufgezeigt werden. Hierzu wurden mittels SFRD („supercritical fluid reactive deposition”)-Verfahren in Kooperation mit verschiedenen Instituten des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT, Deutschland), ausgehend von dem Vorläuferkomplex $\text{PtMe}_2(\text{COD})$, durch Variation der Versuchsbedingungen drei unterschiedliche Pt-Präparationen synthetisiert und im Anschluss eingehend charakterisiert. So wurden diese mittels elektronenmikroskopischer Methoden als Pt-Partikel der Durchmesser $> 100\text{ nm}$, $< 100\text{ nm}$ und $< 20\text{ nm}$ identifiziert. Dabei bestanden die Pt-Partikel $> 100\text{ nm}$ vornehmlich aus Pt-Agglomeraten bis zu einer Größe von 500 nm , wobei in dieser Präparation vereinzelt auch Pt-Partikel mit Durchmessern $< 150\text{ nm}$ enthalten waren. Die Pt-Präparation mit Pt-Partikeln $< 100\text{ nm}$ wies eine breite Partikeldurchmesserverteilung mit Pt-Partikeln eines Durchmesserbereichs von $6 - 66\text{ nm}$ auf. Die als $\text{Pt} < 20\text{ nm}$ charakterisierte Pt-Präparation war mit einer typischen Größe von $\leq 10\text{ nm}$ dagegen als monodispers einzustufen. Zur Beurteilung des Agglomerationsverhaltens der Pt-Partikel unter Zellkulturbedingungen wurde exemplarisch für $\text{Pt} < 20\text{ nm}$ mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen sowie Bildanalyse und statistischer Auswertung die Partikeldurchmesserverteilung (PSD) der Partikel nach Inkubation mit serumhaltigen Zellkulturmedium bestimmt. Dabei konnte nach einem Zeitraum von 24 h eine geringe Agglomeration der Pt-Partikel festgestellt werden.

Mithilfe der FIB/SEM-Technik und nachfolgender elementspezifischer Röntgenanalyse (EDXS) konnte anhand der aus Pt < 20 nm bestehenden Pt-Präparation die Aufnahme von Pt-Partikeln in HT29-Zellen nachgewiesen werden. Hinsichtlich zytotoxischer Eigenschaften der untersuchten Pt-Partikel (Pt > 100 nm, Pt < 100 nm und Pt < 20 nm) in HT29-Zellen wurde, unabhängig von ihrem Durchmesser, über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (0,0001 - 1000 ng/cm² $\hat{=}$ 0,00034 - 3400 ng/ml bzw. 0,002 - 17.429 nM) nach einem Inkubationszeitraum von 24 h weder eine Beeinflussung der Zellviabilität noch der Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen festgestellt. Auch eine Schädigung der Zellmembran war nicht zu beobachten. Des Weiteren zeigten alle Pt-Präparationen in Zellwachstumsuntersuchungen nach Inkubationszeiträumen von bis zu 72 h keine wachstumshemmenden oder -stimulierenden Eigenschaften, so dass insgesamt davon ausgegangen werden kann, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pt-Partikel unter den gewählten Versuchsbedingungen kein zytotoxisches Potential aufweisen.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Modulation des zellulären Redoxstatus wurde nach einer 3-stündigen Expositionsdauer unabhängig vom jeweiligen Partikeldurchmesser über den gesamten Konzentrationsbereich durch keine der Pt-Präparationen eine Beeinflussung der Fluoreszenzintensität im DCF-Assay sowie des nukleären Nrf2-Gehalts festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Exposition von HT29-Zellen gegenüber den untersuchten Pt-Präparationen nicht mit einer Modulation des zellulären ROS-Gehalts verbunden ist. Dem gegenüber war eine durch die Pt-Partikel vermittelte Beeinflussung des intrazellulären tGSH-Gehalts zu beobachten, die sich in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers und der Expositionsdauer hinsichtlich ihrer Ausprägung deutlich unterschied. So zeigten Pt-Partikel > 100 nm weder nach 3- noch nach 24-stündiger Inkubationszeit eine Wirkung auf den tGSH-Gehalt von HT29-Zellen. Pt-Partikel der Durchmesser < 100 nm und < 20 nm führten indes bereits nach einer Expositionszeit von 3 h zu einer Erniedrigung des tGSH-Gehalts, welche nach Verlängerung der Inkubationsdauer von 3 auf 24 h deutlich verstärkt war. Dabei zeigten die Pt-Partikel mit dem kleinsten Durchmesser (< 20 nm) die deutlichste tGSH-Erniedrigung, so dass eine inverse Korrelation zwischen Partikeldurchmesser und Wirksamkeit festzuhalten ist. Des Weiteren war für diese Pt-Präparationen (Pt < 100 nm und Pt < 20 nm) ein vergleichbarer „U-förmiger“ Effektverlauf festzustellen, welcher sich mit zunehmender Expositionszeit noch deutlicher abzeichnete. So wurde die maximale Verminderung des tGSH-Gehalts in einem Konzentrationsbereich von 1 - 10 ng/cm² ($\hat{=}$ 5,8 - 58 ng/ml bzw. 29,7 - 297 nM) erreicht, während in niedrigeren bzw. höheren Konzentrationen eine Zunahme des tGSH-Gehalts bis auf das Niveau der β -CD-Kontrolle zu beobachten war. Der mit zunehmender Konzentration wieder ansteigende tGSH-Gehalt könnte auf eine Agglomeration und damit verbundene Verminderung der Oberflächenreaktivität der Pt-Partikel zurückzuführen sein. Der der tGSH-Depletion zugrundeliegende Mechanismus scheint unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem DCF-Assay und der Bestimmung des nukleären Nrf2-Gehalts nicht auf die Generierung von ROS zurückzuführen zu sein. Denkbar erscheint eine Wechselwirkung des Antioxidans mit löslichen Pt-Spezies oder eine Adsorption des Moleküls an die Oberfläche der Pt-Partikel infolge einer hohen Affinität von Thiolgruppen zu Pt. Diese Hypothese muss allerdings in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

In Analogie zu den Ergebnissen der tGSH-Bestimmung konnte eine mit abnehmendem Partikeldurchmesser und verlängerter Expositionsdauer zunehmende DNA-strangbrechende Wirkung der Pt-Präparationen festgestellt werden. So wurde für Pt-Partikel der Durchmesser < 100 nm und < 20 nm bereits nach 3-stündiger Expositionsdauer eine deutliche Erhöhung der DNA-Strangbruchrate festgestellt, die sich nach einer Inkubationszeit von 24 h geringfügig erhöhte. Pt-Partikel > 100 nm zeigten indes erst nach längerer Expositionsdauer (24 h) eine Beeinflussung der DNA-Integrität, wobei der Wirkungsbereich im Vergleich zu Pt-Partikeln der Durchmesser < 100 nm und < 20 nm auf einen kleineren Konzentrationsbereich beschränkt war. Da es sich bei den Pt-Präparationen mit Pt-Partikeln > 100 nm vornehmlich um Pt-Agglomerate handelte, ist es denkbar, dass die geringere Wirksamkeit auf deren verminderte spezifische Oberfläche oder langsamere zelluläre Aufnahme zurückzuführen ist. Die stärkste DNA-schädigende Wirkung wurde für alle Pt-Präparationen, analog zur tGSH-Bestimmung, nach beiden Inkubationszeiträumen bei einer Konzentration von 1 ng/cm^2 ($\hat{=}$ $4,3 \text{ ng/ml}$ bzw. $21,9 \text{ nM}$) festgestellt. Eine Behandlung der Proben mit dem DNA-Reparaturenzym FPG führte zu einer Erhöhung der DNA-Strangbruchrate, die jedoch lediglich bei der Pt-Konzentration mit der größten DNA-strangbrechenden Wirkung (1 ng/cm^2) statistische Signifikanz erreicht hat.

In Anbetracht der Übereinstimmung der Ergebnisse zur Modulation der DNA-Integrität und des tGSH-Gehalts hinsichtlich der Korrelation zwischen Partikeldurchmesser sowie Expositionsdauer und Ausprägung der beobachteten Effekte, als auch der Tatsache, dass GSH an DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist, ist ein Zusammenhang zwischen der tGSH-Depletion und der DNA-Schädigung denkbar. Auch ein oxidativer Mechanismus kann aufgrund der nach FPG-Behandlung vereinzelt festgestellten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nicht gänzlich ausgeschlossen werden, wenngleich die Ergebnisse des DCF-Assays und der Bestimmung des nukleären Nrf2-Gehalts dagegen sprechen. Da in Untersuchungen hinsichtlich einer Wechselwirkung zwischen Pt und der DNA eine mit der Expositionsdauer zunehmende DNA-Platinierung festgestellt werden konnte und zudem Hinweise auf die Entstehung löslicher Pt-Spezies bestehen, erscheint es wahrscheinlicher, dass die Schädigung der DNA von einer direkten Interaktion zwischen Pt und dem Makromolekül ausgeht. Jedoch stimmten die Ergebnisse zur DNA-strangbrechenden Wirkung und DNA-Platinierung hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte nicht miteinander überein. Welcher Mechanismus letztlich zutrifft, muss daher in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pt-Partikel in HT29-Zellen aufgenommen wurden ohne deren Viabilität oder Wachstum zu beeinträchtigen. Jedoch beeinflussten diese in einem bestimmten Wirkfenster den intrazellulären tGSH-Gehalt sowie die Integrität der DNA. Dabei konnte eine Korrelation zwischen dem Durchmesser der Partikel und deren Wirksamkeit herausgestellt werden. Hinsichtlich des den beobachteten Effekten zugrundeliegenden Mechanismus bestehen Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung des Metalls mit zellulären Strukturen, während durch ROS-Generierung hervorgerufene Effekte weitestgehend ausgeschlossen werden können. Zur näheren Charakterisierung der postulierten Wechselwirkung sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

4.3 Fazit

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die toxikologische Relevanz einwandiger Kohlenstoffnanoröhren (SWCNT) sowie von nanopartikulärem Platin (Pt-NP) für Zellen des Gastrointestinaltrakts. Diese konnte im *in vitro* Zellsystem exemplarisch anhand der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 für beide Nanomaterialien herausgestellt werden. Hierbei konnte mit den eingesetzten elektronenmikroskopischen Methoden für Pt-NP ein direkter Nachweis für deren zelluläre Aufnahme erbracht werden. Der Umstand, dass dies für SWCNTs nicht gelang, zeigt die Notwendigkeit der Anpassung der Nachweismethoden an die jeweiligen Eigenschaften des zu betrachtenden Nanomaterials. Untermuert wird dies durch die mit SWCNTs durchgeführten Untersuchungen zur Modulation des ROS-Gehalts, die auf eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse, resultierend aus einer Interaktion der SWCNTs mit Testmaterialien, hindeuten.

Sowohl für SWCNTs als auch für Pt-NP wurde in der vorliegenden Arbeit ein genotoxisches Potential gezeigt. Hierbei konnte die Expositionsdauer als ein wesentlicher Faktor im Hinblick auf die Ausprägung der DNA-schädigenden Wirkungen herausgestellt werden. So war für beide Nanostrukturen eine mit verlängerter Expositionszeit zunehmende Beeinflussung der DNA-Integrität zu beobachten. Durch den Einsatz von Pt-Partikeln unterschiedlicher Durchmesser konnte zudem ein Zusammenhang zwischen einem spezifischen Charakteristikum eines Nanomaterials und seiner toxikologischen Wirksamkeit aufgezeigt werden. So korrelierte die DNA-strangbrechende Wirkung invers mit dem Durchmesser der Pt-Partikel. Dieser Zusammenhang konnte in Untersuchungen zur Beeinflussung des intrazellulären tGSH-Gehalts verifiziert werden. Somit stellt dieses Ergebnis die entscheidende Bedeutung einer umfassenden Charakterisierung des Testmaterials im Hinblick auf eine fundierte Risikobewertung heraus. Hinsichtlich des der DNA-schädigenden Wirkung zugrunde liegenden Mechanismus bestehen sowohl für SWCNTs als auch für Pt-NP Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung mit der DNA, wenngleich ein auf der Induktion von oxidativem Stress basierender Mechanismus nicht ausgeschlossen werden kann.

Damit sind die in der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse richtungsweisend in Bezug auf ein potentiell Gesundheitsrisiko oral aufgenommener Nanomaterie. Des Weiteren verstärken sie die Forderung nach einer eingehenden Charakterisierung des Testmaterials, der Entwicklung standardisierter, auf das jeweilige Nanomaterial angepasster, Untersuchungsmethoden sowie dem Einsatz eines Spektrums an unabhängigen Testsystemen, um die Sicherheit der gewonnenen Erkenntnisse zu gewährleisten und eine fundierte Datenlage zu schaffen.

Kapitel 5

Material und Methoden

5.1 Materialienverzeichnis

Verbrauchsmaterialien:	Hersteller:
Costar® [®] , 96-Loch, steril	Corning, N.Y., USA
Coplinbecher (Glas, Plastik)	Merck KGaA, Darmstadt
Deckgläser	Menzel-Gläser
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5, 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Glaspipetten	VWR
Kanülen 0,9 x 40 mm	VWR
Kulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Multipettenaufsätze (1, 5, 10 ml)	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Papierbox für Eppendorfreaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Petrischalen, d = 5, 10 cm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen (5 ml)	VWR
Pipettenspitzen (blau, gelb, klar)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
„Quadriperm“-Inkubationsgefäße	Heraeus instruments, Hanau

Reagenzienreservoir (25 ml)	VWR
13, 15, 50 ml Röhre	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Superfrost®Objektträger	Menzel-Gläser
TC-Platten, 24-Loch, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
TC-Platten, 96-Loch, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
TC-Platten, 96-Loch, steril, schwarz	Corning, N.Y., USA
6er Transwell-Platte mit 24 mm Insert Polyester membran, steril	Corning, N.Y., USA
Whatman Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman und Schleicher & Schuell
1,5 mm Whatman Papiere	Whatman und Schleicher & Schuell
Zellschaber, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Allgemeine Chemikalien:

Agarose	Bio-Rad
• "low melting agarose (LMA)" • "normal melting agarose (NMA)"	
Ammoniumperoxosulfat(APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin-Standard	Pierce Biotechnologie, Rockford, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
n-Butanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DAPI/SR101	Partec GmbH, Münster

2', 7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure (HAc) 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (EtOH) p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutaraldehyd 50 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Glutathion, oxidierte Form (GSSG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
L-Glutathion, reduzierte Form (GSH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Igepal CA-300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2HPO_4)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze
Kupfersulfat 4 % (w/v) ($CuSO_4$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ladepuffer 1 x SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Luminol-Lösung 20 x (LumiGlo)	Roche Applied Science

Magnesiumchloridhexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Fluka, München
Methanol (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid (NaN_3)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze
Natriumcacodylat p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumcholat (NaC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natrium-Lauroylsarcosinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), reduziert	Fluka, München
Nonidet® P40 (10 %)	EuroClone S. p.A.
Osmiumtetroxid > 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
o-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PIPES (2-[4-(2-Sulfoethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Proteaseinhibitor complete	Roche, Basel, CH

Rotiphorese 30 (37,5:1), Acrylamid 30 % wässrige Lösung mit 0,8 % N, N'-Methylenbisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salpetersäure (HNO ₃), p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Salzsäure (HCl) 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Spectra Multicolor	Fermentas Life Sciences
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sulfosalicylsäure (SSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triethanolamin (TEA)	Fluka, München
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween® 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Vinylpyridin (2-VP)	Fluka, München
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), suprapurum	Merck KGaA, Darmstadt
Testsubstanzen:	
β-Cyclodextrin	Prof. M. Türk, KIT (Deutschland)
Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWCNT)	Prof. M. Kappes, KIT (Deutschland); Dr. F. Hennrich, Institut für Nanotechnologie, Forschungszentrum Karlsruhe (Deutschland)
Platin (Pt)-NP:	Prof. S. Bräse, Prof. M. Türk, KIT (Deutschland)
Positivkontrollen:	
DL-Buthionin-[S,R]-sulfoximin (BSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

<i>tert</i> -Butylhydrochinon (tBHQ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Etoposid (ETO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hydroxyurea (HU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Menadion (MEN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
4-Nitrochinolin-N-oxid (NQO)	Prof. L. Lehmann, Universität Würzburg, Deutschland
Quercetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Vinylpyridin (2-VP)	Fluka, München

Kits/Handbücher:

Amplex [®] Red Assay	SaBiosciences, Frederick, USA
Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	Roche Applied Science
Cytotoxicity Detection (LDH)	Roche Applied Science
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Applied Science
DNeasy [®] Blood & Tissue	Qiagen GmbH

Antikörper:

Anti- α -Tubulin	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p-p53	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-rabbit antibody, HRP-linked IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Goat anti-mouse, CY3-konjugiert	Jackson Immuno Research
Anti-”CREST” (Centromer positive Control)	DPC Biermann, Bad Nauheim
Anti-Nrf2	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Lamin B	Santa Cruz, Heidelberg

Enzyme:

Glutathionreduktase aus Backhefe (GR)	168 U/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Katalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Zellkultur:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HT29)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (V79)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (farblos)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's Modified Eagle's Medium /F12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hamster Lungenfibroblasten	AK Prof. L. Lehmann, Universität Würzburg, Deutschland
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT29	DSMZ, Braunschweig
Humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	AK Prof. M. Metzler, Universität Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/ mg)	Serva GmbH, Heidelberg

5.2 Geräteverzeichnis

Gerät:	Modell/Hersteller:
Autoklav	Systec D-150, Systec GmbH, Weitenberg
Blotter	PerfectBlue Semi-dry Elektrobloetter, Peqlab, Sandford, UK; Trans-Blot [®] Cell, 49 BR 3584, Bio-Rad
Brutschrank	WTB-Binder CO ₂ -Brutschrank CB210, Binder, Tuttlingen; Heracell 240 i, CO ₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific

Eismaschine	Combi Line, Wessamat; MF 46, Scotsman Frimont
Elektrophorese-Kammer	Perfect-Blue™, Vertical Electrophorese System, Peqlab
Elektrophorese- Spannungswandler	Consort E835, Consort; Electrophorese Power Supply EV231, Peqlab
Geldokumentationsgerät	LAS-3000 Fujifilm intelligent dark box, B 00001851, Software: Image Reader LAS 3000 V2.1; AIDA V3.52.046; LAS-4000, Luminescent Image Analyser, Fujifilm Software: Image Reader LAS 4000; Auswertung: Multi Gauge V3.2; Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Handhomogenisator	Homogenisator „tight Pistill“ (Wheaton Glashomogenisator)
Heiz-Magnetrührer	IKA® RH basic 2, IKA®-Werke, Staufen Magnetic Stirrer HI 300N, HANNA instruments; IKA® RCT basic, safety control
Kühl-/Gefrierschränke/ −80 °C Ultratiefkühlschränke	Liebherr Premium und Comfort (4 °C, −20 °C), Liebherr Ultra low temperature freezer, Modell U725-86 EUBiofreezer, New Brunswick IKA® RH basic 2, IKA®-Werke, Staufen

Mikroskopie	Inversmikroskop Axiovert 40C, Zeiss Objektive: A-Plan, 5 x/ 0,12 Ph0, CP-A Chromat 10 x/ 0,25 Ph1 Okular: PL 10 x/ 18 Durchlicht/Fluoreszenzmikroskop Axioskop, Zeiss Objektiv: Plan-Neoflux 100 x/ 1,3 (Öl) 440480 Okular: P1 10 x/ 20 Filter: 365 FT 395, LP 420 UV: BP 450-490, FT 510, LP 520 Fluoreszenzmikroskop Eclipse E400 (Nikon, Düsseldorf) Objektiv: Plan Apo 60xA/1.40, 100x/1.4 (Öl) Okular: 10 x/22 Fluoreszenz-Filtereinsätze: UV-2A (DAPI, Ex¹: 330-380, DM²: 200, BA³: 420), G-2A (Rhodamin, Ex¹: 510-560, DM²: 575, BA³: 590), FITC (Ex¹: 465-495, DM²: 505, BA³: 515-555), Tripelfilter Mikroskopkamera SPOT-RT monochrome CCD-Digitalkamera (Visitron Diagnostic Systems); Software: MetaView (Universal Imaging Corp.)
Mikrotiterplattenlesegeräte	Victor³V 1240 Multilable Counter, Perkin Elmer GENios (Tecan, Crailsheim) mit Auswerte-Software: XFluor4
Mikrowellenaufschlussgerät	Ethos 1600, MLS Milestone, Deutschland
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter, Elektrode: 1420-040, HANNA instruments Messkette: Mettler Toledo, Inlab 408/120 CG 817 mit Elektrode BlueLine 12 (Schott AG, Mainz); Mettler Toledo Seven Easy, Mettler Toledo
Pipetten, Multipetten, Pipettus	Multipette Plus, Eppendorf Eppendorf Research P 2,5 -P 5000, Eppendorf Pipettus Akku, Hirschmann Laborgeräte
Pumpen	Vakuumsaugpumpe Laboport® (KNF Neuberger) Hitachi L-6210 Intelligent Pump (Merck); Vakuumsaugpumpe Laboport®, IBS Integra Biosciences
Schüttler	Überkopfschüttler Roto-Shake-Genie, Peqlab Biotechnologies, Erlangen
Spektralfotometer	Nanodrop 2000c Spectrofotometer, Peqlab Biotechnology GmbH

Sterilbank	KR-130 BW, Kojair Tech Oy, Finnland Heraeus HS12, Heraeus instruments, Hanau; Hera Safe KS 18, Thermo Fischer Scientific
Thermocycler	MJ Research PTC-200, Peltier Thermal Cycler Thriller, Peqlab Biotechnologies, Erlangen
Trockenschrank	Binder, ATP line TM ED (E2), Binder GmbH
Ultraschallstab	Branson Sonifier 450, Branson
Ultraschallbad	Ultraconic Cleaner, VWR
UV-B-Bestrahlungsgerät	BLX-312, Peqlab
Vortex	Vortex MS Minishaker IKA®, VWR; Vortex Genie 2TM, Bender und Hobein AG; Bio Vortex V1, Peqlab Biotechnologies; Vortex Genie 2, Scientific Industries
Waagen	Analysenwaagen: CP124 S, Sartorius AG, Göppingen; New Classic MF, ML204/01, Mettler Toledo; Grobwaagen: 1574 MP8-2, Sartorius AG, Göppingen; New Classic MF, ML6001/01
Wasserbad	SW-2004, VWR; GD 100, Grant
Zentrifugen	Tischzentrifugen: 5415 Eppendorf AG, Hamburg; 5415C Eppendorf AG, Hamburg; 5417R, Eppendorf AG, Hamburg; Mikro 220R, Hettich Zentrifugen; Mikro 200, Hettich Zentrifugen; Rotina 420R, Hettich Zentrifugen; Galaxy MiniStar, VWR Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg Zytofuge, Megafuge 1.0R, Heraeus, Thieme Labortechnik GmbH

5.3 Raman-Spektroskopie

Raman-Spektroskopie, benannt nach dem indischen Physiker C. V. Raman, bezeichnet die spektroskopische Untersuchung der unelastischen Streuung von Licht an Molekülen oder Festkörpern und wird vornehmlich zur Analyse biologischer, chemischer und pharmazeutischer Proben eingesetzt. Ferner findet diese Methode Anwendung bei der chemischen und physikalischen Charakterisierung von Halbleitermaterialien, Mineralien, Polymeren oder Katalysatoren. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Analysemethode angewandt, um ein geeignetes Dispersionsmittel für die zu untersuchenden SWCNTs zu ermitteln (siehe Abschnitt 4.1.1).

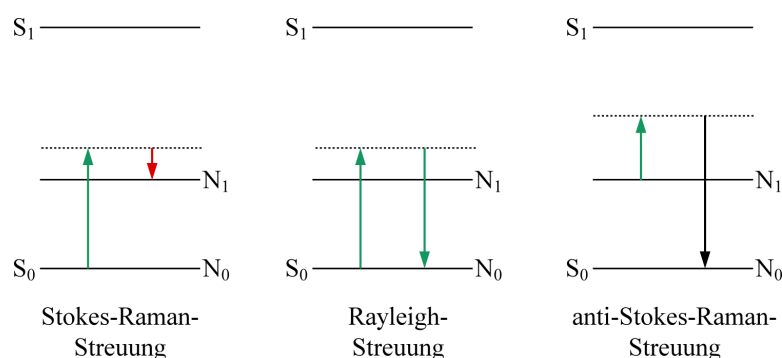


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Energiezustände bei Raman- und Rayleigh-Streuung. Bei der Raman-Streuung kann die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts (grüner Pfeil) entweder zum langwelligen Spektralbereich (Stokes-Raman-Streuung; roter Pfeil) bzw. zum kurzwelligen Spektralbereich (anti-Stokes-Raman-Streuung; schwarzer Pfeil) verschoben sein. Bei Rayleigh-Streuung ist die Frequenz der Streustrahlung gegenüber der eingestrahnten Frequenz unverändert [Schrader, 1995]. S_0 , N_0 = elektronischer bzw. Schwingungs-Grundzustand, S_1 , N_1 = 1. elektronischer- bzw. schwingungsangeregter Zustand.

Nach Bestrahlung der zu untersuchenden Materie mit monochromatischem Licht, wird dieses gestreut. In Abhängigkeit der Wechselwirkung zwischen dem Licht und den Molekülen resultiert Streulicht unterschiedlicher Frequenz. Die Wechselwirkung kann dabei als Stoßvorgang angesehen werden. Bei einem elastischen Stoß eines Photons bestimmter Energie mit einem Molekül verändert sich weder der Energiezustand des Moleküls noch die Frequenz der Streustrahlung im Vergleich zur Frequenz des eingestrahnten Lichts. Diese Streuung wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet (siehe Abb 5.1). Bei einem inelastischen Stoß zwischen Photon und Molekül wird hingegen Energie zwischen diesen ausgetauscht. Besitzt das Molekül nach dem Stoß eine höhere Schwingungsenergie, resultiert daraus energieärmeres Streulicht, welches damit eine geringere Frequenz aufweist. Die zu beobachtenden Spektrallinien werden als Stokes-Linien bezeichnet (siehe Abb 5.1). Geht der Stoß dagegen mit einer niedrigeren Schwingungsenergie des Moleküls einher, erhöht sich die Energie des gestreuten Lichts und somit auch dessen Frequenz. Die daraus resultierenden Spektrallinien werden anti-Stokes-Linien genannt (siehe Abb 5.1). Diese beiden Möglichkeiten der inelastischen Streuung von eingestrahltm Licht werden unter dem Begriff des Raman-Effekts zusammengefasst, auf dem die Raman-Spektroskopie beruht. Durch die für ein Material charakteristischen Frequenzunterschiede der Streustrahlung und des eingestrahnten

Lichts können anhand des daraus resultierenden Raman-Spektrums Rückschlüsse über die Eigenschaften des zu untersuchenden Materials gezogen werden. Näheres hierzu ist in Grasselli und Bulkin [1991] und Schrader [1995] zu finden.

5.4 Rasterkraftmikroskopie

Durchmesser und Länge der untersuchten SWCNTs wurden mittels Rasterkraftmikroskopie („atomic force microscopy“, AFM) bestimmt (siehe Abschnitt 4.1.1). Das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops beruht darauf, dass Oberflächen durch eine an einer Blattfeder (sog. „cantilever“) befestigte Nadel zeilenweise in einem definierten Raster abgetastet werden. Durch die Oberflächenstruktur des jeweiligen Materials verbiegt sich die Blattfeder positionsabhängig unterschiedlich stark. Die Verbiegung bzw. Auslenkung der Blattfeder kann mittels optischer Sensoren gemessen werden. Hierzu wird ein Laserstrahl an der Rückseite der Blattfeder in eine Photodiode reflektiert. Durch das punktweise Aufzeichnen der Ablenkungen lässt sich eine Abbildung der Oberfläche erzeugen. Näheres hierzu ist in Giessibl [2003] zu finden.

5.5 Bestimmung des Nickel- und Cobalt-Gehalts der einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (SWCNT)

Zur Herstellung von sowohl ein- als auch mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren werden metallische Katalysatoren in nanopartikulärer Form, darunter insbesondere Übergangsmetalle wie Fe, Co, Ni oder Mo, eingesetzt. Hierbei können im Endprodukt Metallgehalte von bis zu 30 wt.% erreicht werden. Wenngleich der Metallgehalt von Kohlenstoffnanoröhren im Anschluss an ihre Herstellung mittels diverser Aufreinigungsverfahren reduziert wird (siehe Abschnitt 2.8.2), ist eine vollständige Entfernung metallischer Verunreinigungen nicht möglich, ohne die Kohlenstoffnanoröhren zu zerstören. Da metallische Rückstände einen Beitrag zur biologischen Aktivität dieses Nanomaterials leisten können, ist es für die Zuordnung der zellulären Effekte von entscheidender Bedeutung, den Metallgehalt des Untersuchungsmaterials zu quantifizieren.

Die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs wurden unter Einsatz von Ni und Co synthetisiert (siehe Abschnitt 2.8.2). Die Bestimmung des Ni- und Co-Gehalts der SWCNTs wurde von Dr. Ch. Hartinger (Institut für Anorganische Chemie, Universität Wien) durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl der SWCNT-Stammsuspension (10 µg SWCNTs/ml) mit 1 ml 34%-iger HNO₃ (p.a., Sigma-Aldrich) sowie 50 µl H₂O₂ (suprapurum, Merck) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Im Anschluss wurde die Suspension durch Mikrowellen aufgeschlossen (3,5 h, 180 °C, Gerät: Ethos 1600, MLS Milestone, Deutschland) und mittels ICP-MS analysiert. Der ermittelte Ni- bzw. Co-Gehalt (Doppelbestimmung) wurde als µg Ni bzw. Co pro 1 µg SWCNTs (angegeben in wt.%) berechnet.

5.6 Zellkultur

5.6.1 Zelllinien

HT29-Zelllinie Die Zelllinie HT29 wurde im Jahre 1964 aus einem primären Adenokarzinom des Kolons einer 44-jährigen Frau kaukasischer Herkunft etabliert. Der als heterotransplantabel beschriebene Tumor bildet gut differenzierte Tumore ersten Grades aus. Die adhärent und epithelartig wachsenden HT29-Zellen besitzen einen hypertriploiden Karyotyp mit 17,5 % Polyploidie. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt 40 - 60 h [DSMZ, Braunschweig].

Caco-2-Zelllinie Die Zelllinie Caco-2 wurde im Jahre 1974 aus einem primären Adenokarzinom des Kolons eines 72-jährigen Mannes kaukasischer Herkunft etabliert. Die adhärent und epithelartig wachsenden Caco-2-Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 80 h [DSMZ, Braunschweig].

V79-Zelllinie Die Zelllinie V79 wurde im Jahre 1958 aus dem Lungengewebe eines männlichen chinesischen Hamster etabliert. Die adhärent wachsenden V79-Zellen besitzen einen diploiden Karyotyp mit 20 % Polyploidie. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 16 h [DSMZ, Braunschweig].

5.6.2 Kultivierung von Monolayerkulturen

Als Kulturmedium für HT29- und V79-Zellen wird „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, ohne Natriumpyruvat, Invitrogen) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS) eingesetzt. FKS dient der Wachstumsförderung. Zur Kultivierung von HT29-Zellen wird das Kulturmedium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, 10.000 Einheiten / 10.000 µg pro ml) supplementiert, während V79-Zellen unter Zusatz von 2 % Penicillin/Streptomycin (P/S, 20.000 Einheiten / 20.000 µg pro ml) und 2% L-Glutamin kultiviert werden. Caco-2 Zellen werden in DMEM/F12 (mit L-Glutamin, 3,15 g/l Glukose und 15 mM HEPES; ohne Natriumbicarbonat, Sigma/Aldrich/Fluka) unter Zusatz von 1,2 g/l Na₂CO₃, 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, 10.000 Einheiten / 10.000 µg pro ml) und 10 % FKS kultiviert.

Die verwendeten Zelllinien werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

5.6.2.1 Reagenzien

DMEM:	+ 4,5 g/l Glukose
	+ L(–) Glutamin
	– Pyruvat
	+ Phenolrot

10 x PBS („Phosphate buffered saline“, PBS):	NaCl	1710 mM	(99,9 g/l)
	Na ₂ HPO ₄	100 mM	(14,2 g/l)
	KCl	34 mM	(2,5 g/l)
	KH ₂ PO ₄	18 mM	(2,4 g/l)
In H ₂ O _{bidest} lösen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, mit H ₂ O _{bidest} auffüllen, und auf 1 x PBS verdünnte Lösungen autoklavieren, Lagerung bei 4 °C.			
Trypsin-Lösung:	Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/mg)	500 mg	
	EDTA	250 mg	
	10 x PBS	100 ml	
In H ₂ O _{bidest} lösen, über Nacht auf Eis rühren lassen, pH-Wert überprüfen (7 - 7,4), mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen, steril filtrieren (Porengröße 0,22 µm) und aliquotieren (5 ml), Lagerung bei -20 °C.			
Trypanblau-Lösung:	Trypanblau	0,40 % (v/v)	
	NaCl	0,81 % (w/v)	
	KH ₂ PO ₄	0,06 % (w/v)	
DAPI/SR 101-Lösung:	TRIS	200 mM	(24,23 g/l)
	NaCl	200 mM	(11,69 g/l)
	DAPI	8 µM	(0,003 g/l)
	SR 101	50 µM	(0,03 g/l)
	In H ₂ O _{bidest} lösen und auf pH-Wert 7,6 einstellen.		
Methanol	p.a., -20 °C		

5.6.2.2 Mediumwechsel

Aufgrund einer Anreicherung von Stoffwechselprodukten sowie einer Abnahme der zugesetzten Nährstoffe, kommt es durch eine Absenkung des pH-Wertes im Nährmedium etwa alle zwei bis vier Tage zum Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators Phenolrot von rot nach

gelb. Um ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen zu gewährleisten, ist folglich, je nach Zelllinie und Verdopplungszeit, spätestens beim Eintreten des Farbumschlags ein Wechsel des Nährmediums erforderlich. Befinden sich die Zellen in einer subkonfluenten Wachstumsphase, so wird das verbrauchte Medium abgesaugt und durch frisches, auf 37 °C temperiertes Medium ersetzt. Die Menge beträgt je nach Kulturflaschengröße 40 ml (175 cm²) bzw. 20 ml (80 cm²) [Lindl, 2002].

5.6.2.3 Passagieren

Viele Tumor- oder transformierte Zellen wachsen nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz als „Second- bzw. Polylayer“ weiter. Allerdings sinkt bei zu hoher Zelldichte die Proliferationsrate der Zellen. Nach dem Erreichen der Maximaldichte kann sich der Zellrasen vom Flaschenboden ablösen, wodurch die Zellen absterben können. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Zellen regelmäßig zu passagieren, d.h. die Zelllinie unter Verdünnung weiter zu kultivieren.

Durchführung

- Vorhandenes Medium mithilfe einer sterilen Pasteurpipette entfernen.
- Zur vollständigen Entfernung von Mediumresten, Zellen mit 5 ml einer sterilen, auf 37 °C temperierten phosphatgepufferten Lösung (PBS) waschen.
- Zellrasen mit Trypsin-Lösung (etwa 2,5 ml für eine Kulturflasche der Größe von 175 cm²) überschichten und 2 - 3 min (HT29-, Caco-2 und V79-Zellen) bei 37 °C inkubieren. Eine zu lange Einwirkzeit kann zu einer irreversiblen Zellschädigung bzw. zur Zellyse führen.
- Zellen zum Inaktivieren des Trypsins direkt im Anschluss mit 10 ml eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums resuspendieren.

Eine ausreichende Menge der Zellsuspension wird in der Kulturflasche belassen und mit 40 ml (bei einer Flaschengröße von 175 cm²) eines 10 % FKS-haltigen, auf 37°C temperierten Zellkulturmediums versetzt und unter den in Abschnitt 5.6.2 beschriebenen Bedingungen weiter kultiviert. Zwischen zwei Subkultivierungen sollten mind. 24 h liegen, da frisch passagierte Zellen Zeit benötigen, um sich am Flaschenboden abzusetzen und anzuwachsen. Nach zwei- bis dreimaligem Passagieren sollten die Zellen in eine neue Kulturflasche überführt werden. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass Monolayerkulturen mit steigender Kultivierungszeit bzw. Passagenzahl ihre physiologischen Eigenschaften verändern. Deswegen sollten Zelllinien nach etwa 30 Passagen (je nach Zelllinie) verworfen und neue Zellaliquote in Kultur genommen werden [Lindl, 2002].

5.6.2.4 Anlegen und Lagerung von „Zellstocks“

Durchführung

- Nach Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden (siehe Abschnitt 5.6.2.3), diese in 10 ml eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums aufnehmen.

- Je „Zellstock“ 500 μ l einer Dimethylsulfoxid (DMSO)/FKS-Lösung (Verhältnis 1:2,3) in ein Kryoröhrchen vorlegen und 1 ml Zellsuspension zugeben. DMSO dient hierbei als Frostschutzmittel.
- Direkt im Anschluss „Zellstocks“ für 24 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ einfrieren und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in flüssigem Stickstoff lagern.

5.6.2.5 Inkulturnahme von Zellen

Durchführung

- Gefrorene „Zellstocks“ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad auftauen.
- Zellen zur Verringerung der toxischen DMSO-Konzentration umgehend mit der 10-fachen Menge an 20 % FKS-haltigem Zellkulturmedium versetzen.
- Zellsuspension bei RT für 5 min bei $130 \times g$ zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Zellpellet mit 5 ml eines 20 % FKS-haltigen Zellkulturmediums resuspendieren.
- Zellsuspension in eine Kulturflasche der Größe von 25 cm^2 überführen und 5 ml eines 20 % FKS-haltigen Zellkulturmediums zugeben.

Die Zellen werden bis zum Erreichen einer konfluenten Wachstumsphase in 20 % FKS-haltigem Zellkulturmedium kultiviert und beim anschließenden Passagieren auf 10 % FKS-haltiges Nährmedium umgestellt.

5.6.2.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach Anfärben eines definierten Volumens der Zellsuspension mit dem Diazofarbstoff Trypanblau. Das Auszählen der Zellen unter dem Lichtmikroskop wird mithilfe der Neubauer-Zählkammer, auch Hämozytometer genannt, durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Glasplatte mit vertiefter Mittelfläche, auf der quadratische Felder eingätzt sind. Durch Auflegen eines plangeschliffenen Deckglases entsteht ein Zwischenraum definierten Volumens, in den die angefärbte Zellsuspension eingebracht wird. Die Mittelfläche der in dieser Arbeit verwendeten Neubauer-Zählkammer besteht aus neun Quadraten (siehe Abb. 5.2) mit einer Fläche von je 1 mm^2 und einer Vertiefung von je $0,1\text{ mm}$, so dass je Quadrat ein definiertes Volumen von $0,1\text{ }\mu\text{l}$ resultiert. Bei der Zellzahlbestimmung werden nur die Zellen innerhalb der Eckquadrate berücksichtigt ($Q_k, k = 1...4$). Die Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau beruht darauf, dass intakte Zellen den durch die Membran diffundierten Farbstoff aktiv aus der Zelle transportieren können. Tote Zellen sind dazu nicht mehr fähig, wodurch sie unter dem Mikroskop blau erscheinen. In jedem der vier Großquadrate werden die lebenden (weiss dargestellt) und toten (blau dargestellt) Zellen gezählt. Die grau dargestellten Zellen befinden sich ausserhalb des zu beachtenden Zählbereichs und werden somit aus der Zellzahlbestimmung ausgenommen. Die Auszählung über die einzelnen Großquadrate erfolgt nach dem in der Abbildung 5.2 durch den blauen Pfeil dargestellten Schema. Die Gesamtzahl der Zellen pro Milliliter n berechnet sich wie folgt:

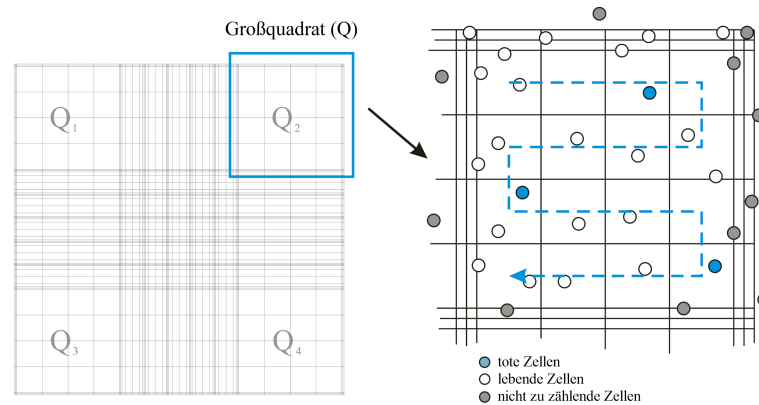


Abbildung 5.2: Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer mit den Großquadrate $Q_1 \dots Q_4$. Modifiziert nach Lindl [2002].

$$n = 10000 \cdot f \cdot \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 N_k + n_k$$

Wobei

- N_k die Anzahl der lebenden Zellen in Großquadrat Q_k ,
- n_k die Anzahl der toten Zellen in Großquadrat Q_k und
- f den Verdünnungsfaktor

darstellen. Der Verdünnungsfaktor f entspricht der Verdünnung der Zellsuspension mit der Trypanblau-Lösung.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl pro Milliliter n_{leb} werden nur die lebenden (weiss dargestellt) Zellen berücksichtigt. Die Berechnung erfolgt analog nach folgender Formel:

$$n_{leb} = 10000 \cdot f \cdot \frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 N_k$$

Durchführung

- Passagierte Zellen (siehe Abschnitt 5.6.2.3) resuspendieren und mit einer entsprechenden Menge an Trypanblau-Lösung versetzen (hier: 1 Volumenanteil Zellsuspension und 9 Volumenanteile Trypanblau-Lösung).
- Angefärbte Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Zählkammer und Deckglas einbringen.
- Eckquadrante unter dem Lichtmikroskop auszählen.

5.6.2.7 Überprüfung auf Mykoplasmenkontamination

Mykoplasmen sind die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryoten. Sie besitzen keine Zellwand und können somit in ihrer Größe (0,22 μm bis 2 μm) und in ihrer Gestalt variieren. Sie sind in der Lage Sterilfilter zu passieren und zeigen sich gegenüber der in der Zellkultur eingesetzten Antibiotika als unempfindlich. Bei Anwesenheit von Mykoplasmen wird der Stoffwechsel

der kultivierten Zellen beeinflusst. Daher ist eine regelmäßige Überprüfung der Zellen auf Mykoplasmenkontamination erforderlich.

Durchführung

- Einen sterilen Superfrost[®] Objektträger (OT) in eine mittlere Gewebekulturschale ($\varnothing$ 10 cm) mit 10 ml eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums geben und wenige Tropfen Zellsuspension darauf pipettieren.
- Zellen für 24 - 48 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultivieren bzw. auf dem OT absetzen lassen.
- Medium entfernen und OT mit –20 °C kaltem Methanol waschen.
- Zellen mind. 30 min in –20 °C kaltem Methanol auf dem OT fixieren.
- 3 - 4 Tropfen 4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)-Sulforhodamin (SR) 101-Färbelösung auf den OT pipettieren und mit einem Deckglas bedecken.

Auswertung Die Überprüfung auf Mykoplasmen erfolgt mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Anregungswellenlänge 450 - 490 nm). DNA erscheint blau, das Zytosol ist rot gefärbt. Mykoplasmen sind aufgrund ihres DNA-Gehaltes als blaue Punkte in Kernnähe oder im Zytoplasma zu sehen [Lindl, 2002].

Die Durchführung aller in dieser Arbeit beschriebenen Experimente erfolgte ausschließlich unter Verwendung mykoplasmenfreier Zellen.

5.7 Zellinkubation

5.7.1 Zellinkubation mit SWCNTs

Die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs („single walled carbon nanotubes“) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Kappes (Institut für Physikalische Chemie II, KIT) durch Herrn Dr. F. Hennrich (Institut für Nanotechnologie, Forschungszentrum Karlsruhe) synthetisiert und freundlicherweise für die beschriebenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Nach vorausgegangenen Untersuchungen zum SWCNT-Dispersionsvermögen verschiedener grenzflächenaktiver Stoffe mittels Raman-Spektroskopie und nachfolgender Ermittlung der Zytotoxizität als geeignet befundener Dispersionsmittel in HT29-Zellen mittels Sulforhodamin B (SRB)-Assay (siehe Abschnitt 5.10.2) wurde das durch Laserablation hergestellte SWCNT-Pulver in 1 %-iger (w/v) Natriumcholat (NaC)-Lösung suspendiert, 2 h mit Ultraschall behandelt und mittels Gradientenzentrifugation gereinigt. Die Konzentration an SWCNTs in dieser SWCNT/NaC-Stammsuspension lag konstant bei 10 µg/ml. Zytotoxizitätstests (SRB) in HT29-Zellen haben gezeigt, dass NaC bis zu einer Konzentration von 0,02 % biokompatibel ist, während bei höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte auftreten. Somit konnte nach einer 1:50 Verdünnung (entspricht 0,02 % NaC in der Endkonzentration) der SWCNT-Stammsuspension eine maximale SWCNT-Konzentration

von 0,2 µg/ml für die Untersuchungen eingesetzt werden. Für die toxikologischen Bestimmungen wurde ein Konzentrationsbereich von 0,00001 - 0,2 µg/ml gewählt. Hierzu wurden aus der Stammsuspension zunächst Verdünnungen mit 1 %-iger (w/v) NaC-Lösung hergestellt. Die erhaltenen SWCNT-Verdünnungen wurden im Anschluss mit 10 % FKS-haltigem Zellkulturmedium im Verhältnis 1:50 auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt.

Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über den getesteten Konzentrationsbereich sowie deren Präparation. Alle Inkubationen wurden unter Verwendung von 10 % FKS-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt, da sich die im FKS enthaltenen Proteine an die Oberfläche der SWCNT lagern und dadurch aufgrund sterischer Hinderung und elektrostatischer Abstoßung das Zusammenlagern bereits suspendierter Nanoröhren verhindern [Casey et al., 2007].

Tabelle 5.1: Übersicht der untersuchten SWCNT-Konzentrationen. Die Verdünnungen werden aus einer SWCNT-Stammsuspension der Konzentration 10 µg/ml hergestellt.

SWCNT [µg/ml]	0,0005	0,0025	0,005	0,05	0,25	0,5	2,5	5	10
1 % Natriumcholat									
↓1:50 Verdünnung mit Zellkulturmedium ↓									
SWCNT [µg/ml]	0,00001	0,00005	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2
SWCNT [ng/cm ²]	0,00234	0,0117	0,0234	0,234	1,17	2,34	11,68	23,36	46,73
0,02 % Natriumcholat									

In jedem Versuchsansatz wurde eine Mediumkontrolle sowie eine Inkubation mit 0,02 %-iger NaC-Lösung als Suspensionsmittelkontrolle mitgeführt. Die verwendeten Positivkontrollen sind bei der jeweiligen Versuchsdurchführung genannt.

Das zur Inkubation eingesetzte Volumen ist von der Größe des im jeweiligen Versuch verwendeten Kulturgefäßes abhängig. Da SWCNTs im Medium sedimentieren, wird der Gehalt auf die Wachstumsfläche des Gefäßes bezogen. Als Bezug wurde die Fläche der im alkalischen Comet Assay (siehe Abschnitt 5.12.1) verwendeten Petrischalen (Ø 50 mm) gewählt, da bei diesem Versuch eine Beeinflussung der HT29-Zellen festzustellen war. Das Inkubationsvolumen beträgt bei diesen 5 ml. Hieraus ergibt sich für die höchste SWCNT-Konzentration (0,2 µg/ml) bei einer Wachstumsfläche von 21,4 cm² ein Gehalt von 0,0467 µg/cm². Dieser Wert ist den Berechnungen der Inkubationsvolumina bei Verwendung anderer Kulturgefäße zugrunde gelegt. In Tabelle 5.2 sind die Inkubationsvolumina für die in dieser Arbeit verwendeten Kulturgefäße dargestellt.

Tabelle 5.2: Auf die Fläche normiertes Inkubationsvolumen bei Verwendung von Kulturgefäßen unterschiedlicher Wachstumsfläche.

Kulturgefaß	Wachstumsfläche [cm ²]	Inkubationsvolumen
Petrischale Ø 50 mm	21,4	5 ml
Petrischale Ø 150 mm	152	35,51 ml
Petrischale Ø 100 mm	58	13,55 ml
Quadriperm	24	5,75 ml
Transwell	4,67	1,1 ml
24-Lochplatte	1,9	444 µl
96-Lochplatte	0,34	79 µl

5.7.2 Zellinkubation mit Platin (Pt)

Die in dieser Arbeit untersuchten Pt-NP wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Türk (Institut für Technische Thermodynamik und Kältetechnik) und Prof. S. Bräse (Institut für Organische Chemie) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) synthetisiert (siehe Abschnitt 2.9.2).

Die Inkubation erfolgte mit Pt-NP dreier unterschiedlicher Größen. Hierbei bezeichnet Pt < 20 nm Pt-NP mit einem Durchmesser von < 20 nm, Pt < 100 nm Pt-NP mit einem Durchmesser < 100 nm sowie Pt > 100 nm Partikel eines Durchmessers größer 100 nm. Die eingesetzten Pt-NP liegen allerdings nicht als reines Platin vor. Bedingt durch das ihnen zugrunde liegende Herstellungsverfahren (Abschnitt 2.9.2), werden sie aus einem metallorganischen Vorläuferkomplex auf einem Träger, dem β -Cyclodextrin (β -CD), abgeschieden und liegen in dem für die Untersuchungen eingesetzten Ausgangszustand als Pt-CD-Präparation vor. Die Pt-Gehalte der einzelnen Präparationen errechnen sich demnach aus der bei der Synthese eingesetzten Menge des Pt-Vorläuferkomplexes bzw. dessen Pt-Gehalts und der Menge des eingesetzten β -CD unter der Annahme einer vollständigen Umsetzung. Tabelle 5.3 gibt eine Übersicht über die anteilige Menge der einzelnen Komponenten jeder Pt-Präparation sowie über die jeweils erforderliche Menge der Pt-Präparation, die einem Pt-Gehalt von 1 µg entspricht.

Tabelle 5.3: Übersicht über den Pt- und β -CD-Gehalt jeder Pt-Präparation sowie über die Menge der Pt-Präparation, die einem Pt-Gehalt von 1 µg entspricht.

Pt-Präparation	Pt-Gehalt im Vorläuferkomplex [g]	β -Cyclodextrin-Anteil [g]	Präparationsmenge entspr. 1 µg Pt [mg]
Pt < 20 nm	0,049	4,8049	0,04110
Pt < 100 nm	0,058	2,3132	0,04088
Pt > 100 nm	0,049	4,8049	0,04110

Weiterhin wurde der Pt-Gehalt auf die den Zellen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen zur Verfügung stehende Wachstumsfläche bezogen. Hierzu wurde die in Tabelle 5.3 angegebene Menge an Pt-Präparation mit der Wachstumsfläche der verwendeten Zellkulturgefäße multipliziert und somit die entsprechende Einwaage errechnet, die eine Konzentration von $1 \mu\text{g Pt pro cm}^2$ Wachstumsfläche ergibt. Die für die jeweiligen Wachstumsflächen benötigten Einwaagen der einzelnen Pt-Präparationen, entsprechend einer Konzentration von $1 \mu\text{g/cm}^2$, sind in Tabelle 5.4 aufgeführt.

Tabelle 5.4: Übersicht über die für die einzelnen Wachstumsflächen benötigten Einwaagen der verwendeten Pt-Präparationen, entsprechend einer Pt-Konzentration von $1 \mu\text{g/cm}^2$.

Wachstumsfläche [cm^2]		Einwaage der Pt-Präparation [mg]		
		Pt < 20 nm	Pt < 100 nm	Pt > 100 nm
0,34	(96-Lochplatte)	0,0140	0,1390	0,0140
0,7	(Millicell [®] -System)	0,0288	—	—
1,9	(24-Lochplatte)	0,0822	0,0818	0,0822
4,67	(Transwell)	0,1919	—	—
21,4	(Petrischale Ø 60 mm)	0,8631	0,8585	8631
58	(Petrischale Ø 100 mm)	2,3838	2,3721	2,3838
152	(Petrischale Ø 150 mm)	6,2472	6,2141	6,2472

Die eingewogene Pt-Menge wurde entsprechend einer Konzentration von 1000 ng/cm^2 in Zellkulturmedium suspendiert. Um einer Agglomeration der NP vorzubeugen, wurde die Suspension $10 \times 10 \text{ s}$ mit dem Ultraschallstab behandelt. Ausgehend von dieser Stammsuspension wurden Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von $0,0001 - 1000 \text{ ng/cm}^2$ hergestellt. Hierzu wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung aus der Stammsuspension bzw. der vorherigen Verdünnung in Zellkulturmedium erstellt. Alle Inkubationen wurden unter Verwendung von 10 % FKS-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt, da sich die im FKS enthaltenen Proteine an die Oberfläche der Pt-NP lagern und dadurch aufgrund sterischer Hinderung und elektrostatischer Abstoßung das Zusammenlagern bereits suspendierter Partikel verhindern [Elder et al., 2007]. Um zusätzlicher Agglomeration weiterhin vorzubeugen, erfolgten die Herstellung der Verdünnungen sowie der Inkubationsbeginn unmittelbar nach der Ultraschallbehandlung.

5.8 Untersuchung der zellulären Aufnahme mittels Elektronenmikroskopie

Die Charakterisierung der einzelnen Platinpräparationen sowie die zelluläre Aufnahme und subzelluläre Lokalisation der in dieser Arbeit untersuchten Testpartikel wurde mittels Raster (REM)-

und Transmissions (TEM)-elektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurde ein spezielles Transwell®-System (Corning Life Sciences, USA) verwendet, in dem ein Transwell®-Einsatz („Insert“) mit einer aus Polycarbonat bestehenden Membran die Kulturschale in ein oberes und ein unteres Kompartiment trennt. Die auf der Membran angewachsenen und mit den Testpartikeln inkubierten Zellen werden mit Glutaraldehyd fixiert und nachfolgend mit Osmiumtetroxid behandelt. Osmiumtetroxid dient einerseits der Kontrastierung der Präparate, andererseits der Fixierung von Zellmembranen durch Aufhebung der osmotischen Wirkung. Im Anschluss erfolgt die Entwässerung der Proben mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe und ihre Trocknung mithilfe der sog. überkritischen Trocknung. Das in den Proben enthaltene Wasser wird über Ethanol als Zwischenstufe durch flüssiges CO₂, mit dem sich die überkritische Trocknung am besten durchführen lässt, ersetzt. Durch die überkritische Trocknung werden die Oberflächenkräfte vermieden, die sonst bei der Trocknung auftreten und feine Strukturen beschädigen oder zerstören würden. CO₂ ist dabei besonders gut als Lösungsmittel geeignet, da der kritische Punkt bereits bei 31 °C und 7,375 MPa erreicht ist. Die biologische Probe wird somit wenig beansprucht und die technischen Anforderungen an das Gerät werden gering gehalten [Rieder und Schmidt, 1987].

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Arbeitskreis von Prof. D. Gerthsen (Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Fakultät Physik, KIT) durchgeführt.

5.8.1 Reagenzien

Ethanol:	p.a., durch den Einsatz eines Molekularsiebs der Porenweite 0,3 nm (3 Å) trocknen.
Natriumcacodylat-Puffer:	0,1 M (21,4 g /l) In H ₂ O _{bidest} lösen, mit 0,1 M HCl auf pH 7,4 einstellen. Lagerung bei 4 °C.
Glutaraldehyd-Lösung:	2 % (v/v) 50 %-ige Glutaraldehyd-Lösung mit 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer verdünnen. Verdünnung unmittelbar vor Gebrauch herstellen.
Osmiumtetroxid-Stammlösung:	10 % (w/v) in 96 %-igem Ethanol (p.a.) Zu je 1 ml aliquotieren und bei –80 °C aufbewahren.
Osmiumtetroxid-Gebrauchslösung:	1 % (v/v) Osmiumtetroxid-Stammlösung mit 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer verdünnen. Verdünnung unmittelbar vor Gebrauch herstellen.

Ethanolgradient:	20 % (v/v)
	50 % (v/v)
	75 % (v/v)
	96 % (v/v)
	In 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer herstellen. Verdünnungen bei 4 °C lagern.

5.8.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Um ein besseres Anwachsen der Zellen zu gewährleisten, Membran der Transwell®-Platte vor dem Ausstreuen der HT29-Zellen für 24 h äquilibrieren. Hierzu das obere Kompartiment mit 1,5 ml und das untere Kompartiment mit 2,6 ml eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums versehen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte belassen.
- Medium absaugen, das untere Kompartiment abermals mit 2,6 ml des 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums versehen und in das obere Kompartiment 0,5 x 10⁶ Zellen in 1,5 ml Zellkulturmedium pro Transwell® (Ø 2,4 cm) ausstreuen und 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen.
- Substanzinkubation mit 1,1 ml (SWCNT) und 1,5 ml (Pt) für 24 h durchführen. Zur Inkubation mit Platin wurde eine Konzentration von 1 ng/cm² eingesetzt, während die zelluläre Aufnahme von SWCNT mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml untersucht wurde.

Zellaufarbeitung und Gegenfärbung der Zellen für die Elektronenmikroskopie

- Nach Inkubationsende das Zellkulturmedium über der Membran vorsichtig absaugen und den Membran-Einsatz in eine mit Natriumcacodylat-Puffer gefüllte Petrischale überführen.
- Membran mithilfe eines Skalpells vorsichtig aus dem Einsatz ausschneiden und in 1 ml Natriumcacodylat-Puffer waschen.
- Anschließend Membran zur Fixierung der Zellen mind. 2 h in 5 ml 2 % (v/v) Glutaraldehyd-haltigem Natriumcacodylat-Puffer inkubieren.
- Im Folgenden Zellen mit Osmiumtetroxid (OsO₄) gegenfärben. Hierzu die Membran in 5 ml einer 1 % OsO₄-Lösung 1 h bei 4 °C inkubieren.
- Zur Vorbereitung der Präparate für die überkritische Trocknung mittels CO₂, Zellen unter Einsatz eines aufsteigenden Ethanol-Cacodylatpuffer-Gradienten entwässern. Hierzu die Membran bei 4 °C je 2 x für 15 min in 5 ml jeder Gradientenstufe (20, 50, 75 und 96 %) einlegen. Die Membran kann anschließend eine Woche bei 4 °C gelagert werden.

Überkritische Trocknung

- Die in Ethanol eingelegte Membran zuschneiden und in die Überdruckkammer geben.
- Nach Verschluss der Kammer flüssiges CO₂ einleiten und dieses durch Erhöhung der Temperatur über den kritischen Punkt bringen. Hierbei wird das Ethanol in CO₂ gelöst und durch Druckreduktion aus dem System entfernt.
- Durch mehrmaliges Ablassen des mit Ethanol angereicherten CO₂ über einen Zeitraum von 2 h das gesamte Ethanol aus der Probe entfernen.
- Abschließend den Druck in der Druckkammer reduzieren bis der Umgebungsdruck erreicht ist und die Probe entnommen werden kann.

5.9 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Quantifizierung des Zellproteins erfolgte mittels zweier Methoden, angepasst an das jeweilige Testverfahren. Die Proteingehalte in der Western Blot Analyse wurden mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt, während die Proteingehalte im Glutathion (GSH)-Assay mithilfe der Bicinchoninsäure (BCA) bestimmt wurden. Beide Methoden werden nachfolgend erläutert.

5.9.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die fotometrische Proteinbestimmung nach Bradford [1976] ermöglicht die Quantifizierung von Proteinmengen im Mikrogramm-Bereich (Nachweisgrenze: $\sim 0,5 \mu\text{g}$). Sie beruht auf der unspezifischen Komplexbildung zwischen dem sauren Farbstoff Coomassie®-Brilliant Blue G250 (siehe Abb. 5.3) und den kationischen und hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren der Zellproteine.

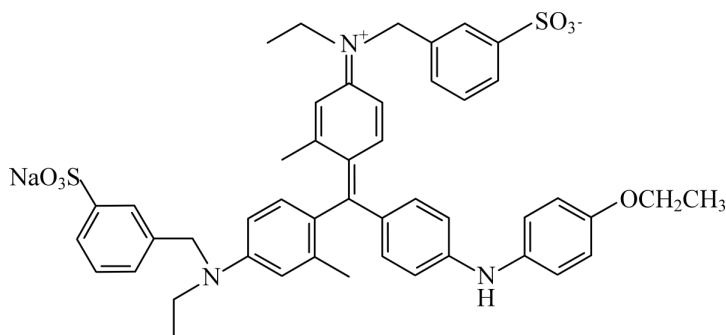


Abbildung 5.3: Strukturformel von Coomassie®-Brilliantblau G250 (als Sulfonat).

Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von $\lambda = 465 \text{ nm}$ (freier Farbstoff) zu $\lambda = 595 \text{ nm}$ (gebundener Farbstoff). Der Farbstoff lagert sich innerhalb von 2 min an die vorhandenen Aminosäuren bzw. Proteine an. Die so gebildeten Komplexe sind für ca. 1 h stabil. Die Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,2 - 1,6 mg/ml wird unter Verwendung einer Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“, (BSA))-Standardlösung (2 mg/ml) erstellt (Tabelle 5.5).

Endkonzentration [mg/ml]	BSA-Standardlösung [μ l]	H ₂ O _{bide} st [μ l]
0,2	20	180
0,4	40	160
0,6	60	140
0,8	80	120
1,0	100	100
1,2	120	80
1,4	140	60
1,6	160	40

Tabelle 5.5: Pipettierschema der BSA-Standardreihe.

5.9.1.1 Reagenzien

Bradford-Reagenz:	Coomassie®-Brilliantblau G250	100 mg
	EtOH	50 ml
	H ₃ PO ₄	100 ml
	Mit H ₂ O _{bide} st auf 1 l auffüllen, 4 Wochen ruhen lassen, anschließend filtrieren und im Dunkeln bei RT lagern.	

5.9.1.2 Durchführung

- Jeweils 10 μ l der Standardreihe (0,2 - 1,6 mg/ml), der Kontrollen (H₂O_{bide}st, Probenpuffer) und der Proben mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzen.
- Jeweils 200 μ l als Triplikat in eine 96-Lochplatte pipettieren und im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 595 nm messen.

5.9.1.3 Auswertung

Der Proteingehalt der Proben wird durch lineare Regression anhand der Kalibriergeraden bestimmt und durch den Nullwert (H₂O_{bide}st) korrigiert.

5.9.2 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinbestimmung mittels BCA („bichinonic acid“) beruht auf der Bildung eines violetten Komplexes aus BCA und einwertigen Kupferionen unter alkalischen Bedingungen [Smith et al.,

1985]. Die Extinktion des farbigen Komplexes wird bei 562 nm fotometrisch gemessen. Kupfer geht in Form von CuSO_4 als zweiwertiges Ion in die Bestimmung ein und wird bei Anwesenheit von Proteinen zu Cu(I) reduziert, wobei der Gehalt an Cu(I) proportional zur Proteinmenge ist (siehe Abb. 5.4). Durch Messung von Proteinstandardlösungen kann mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade erstellt werden, anhand derer die Proteinmengen der Proben bestimmt werden können. Für die Reduktion sind innerhalb eines Proteins die Aminosäuren Cystein, Tryptophan, Tyrosin sowie die Peptidbindung verantwortlich [Wiechelman et al., 1988].

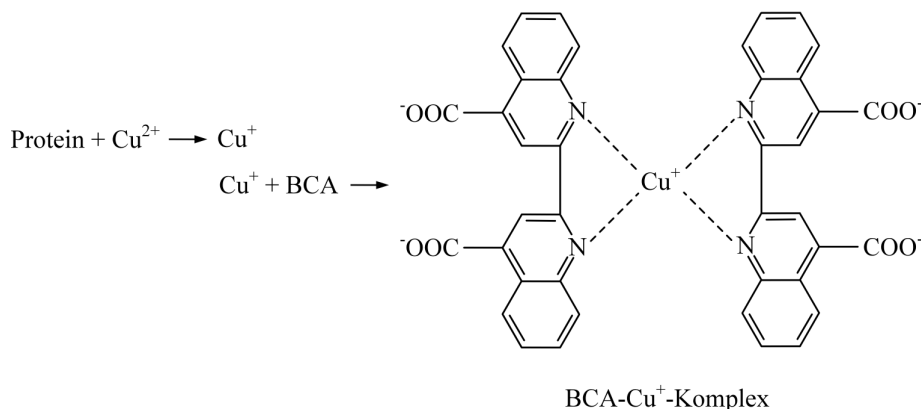


Abbildung 5.4: Bildung des BCA- Cu^+ -Komplexes aus BCA und Cu^{2+} [Smith et al., 1985].

5.9.2.1 Reagenzien

Die beiden benötigten Reagenzien A und B werden als vorgefertigte Lösungen der Firma Sigma eingesetzt.

Reagenz A:	BCA Na_2CO_3 Na-Tartrat NaHCO_3 Substanzen in 0,1 N NaOH gelöst, pH 11,25.
Reagenz B:	$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 % (w/v)
BCA-Reagenzlösung:	Mischung aus Reagenz A:B 50:1
Proteinstammlösung:	BSA 2 mg/ml (siehe Abschnitt 5.9.1)
Proteinstandardlösungen:	Konzentrationsbereich 0,02 - 2 mg/ml Verdünnungen der 2 mg/ml Proteinstammlösung mit A/B-Puffer herstellen.

5.9.2.2 Durchführung

- Die Proteinstandardlösungen des Konzentrationsbereichs 0,02 - 2,0 mg/ml durch Verdünnen einer Proteinstammlösung aus BSA herstellen. In diesem Fall mit A/B-Puffer (siehe Abschnitt 5.11.2.2) verdünnen, da die Messung des Proteingehalts der Glutathion-Bestimmung dient. Als Blindwert A/B-Puffer einsetzen.
- Von den Proteinstandardlösungen je 25 µl in eine 96-Lochplatte pipettieren und mit 175 µl BCA-Reagenzlösung versetzen.
- Die Proben derart verdünnen, dass sie im linearen Bereich der Proteinstandardgeraden liegen. Bei den Proben der GSH-Bestimmung (siehe Abschnitt 5.11.2.2) ist dies mit einer 1:10 Verdünnung der Fall.
- Zu 100 µl der verdünnten Proben 700 µl BCA-Reagenzlösung geben.
- 96-Lochplatte mit Standardreihe für 30 min bei 37 °C im Brutschrank sowie Proben für 30 min bei 37 °C und 1200 rpm im Heizrüttler inkubieren.
- Nach Ablauf der Inkubationszeit die Proben zum Abstoppen der Reaktion auf Eis stellen und je 200 µl in die 96-Lochplatte (ebenfalls auf Eis) pipettieren.
- Anschließend 96-Lochplatte im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 595 nm messen.

5.9.2.3 Auswertung

Der Proteingehalt der Proben wird durch lineare Regression anhand der Kalibriergeraden bestimmt und durch den Nullwert (H_2O_{bidest}) korrigiert.

5.10 Untersuchung zytotoxischer Eigenschaften

Die zytotoxischen Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten NP wurden in Kombination einzelner Testverfahren, welche verschiedene biologische Endpunkte erfassen, bestimmt. Damit soll eine Fehleinschätzung des zytotoxischen Potentials der untersuchten Testpartikel durch falsch positive bzw. negative Ergebnisse, herrührend von möglichen Interferenzen mit den Untersuchungsmaterialien, unterbunden werden.

Zellviabilität, Zellwachstum, mitochondrielle Enzymaktivität und Membranintegrität wurden als biologische Endpunkte ausgewählt und mit den nachfolgend beschriebenen Methoden bestimmt.

5.10.1 Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblau-Ausschluss

Die Bestimmung der Zellviabilität nach Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz erfolgt mittels Trypanblau-Färbung. Die geschädigten Zellen können den Farbstoff Trypanblau nicht mehr aktiv aus der Zelle transportieren und erscheinen unter dem Mikroskop blau gefärbt. Nach Auszählen der lebenden und toten Zellen mithilfe der Neubauer Zählkammer (siehe Abschnitt 5.6.2.6) kann die Zellviabilität bestimmt werden.

5.10.1.1 Reagenzien

Siehe Abschnitt 5.6.2.1.

5.10.1.2 Durchführung

- HT29-Zellen gemäß dem Durchführungsprotokoll des GSH-Assays (siehe Abschnitt 5.11.2.2) und des Comet Assays (siehe Abschnitt 5.12.1.2) ausstreuen, kultivieren und mit den jeweiligen Testpartikeln inkubieren.
- Zellrasen nach erfolgter Testsubstanzinkubation mit dem im jeweiligen Durchführungsprotokoll angegebenen Volumen (siehe Abschnitte 5.11.2.2 und 5.12.1.2) an PBS-Lösung zweimal waschen, um Partikelreste zu entfernen.
- Zellen mit 1 ml (GSH-Assay) bzw. 0,5 ml (Comet Assay) Trypsin für 1 - 2 min inkubieren und anschließend mit 1 ml (GSH-Assay) bzw. 0,5 ml (Comet Assay) eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums von der Kulturschale abspülen und in 15 ml bzw. 2 ml Reaktionsgefäße überführen.
- Eine entsprechende Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung erstellen (GSH-Assay, 1:5 Verdünnung; Comet Assay, 1:2 Verdünnung) und lebende sowie tote Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer auszählen (siehe Abschnitt 5.6.2.6).

5.10.1.3 Auswertung

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Viabilität von HT29-Zellen zu bestimmen, wird der prozentuale Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Die Viabilität $V[\%]$ berechnet sich wie folgt:

$$V[\%] = 100 \cdot \frac{\sum_{k=1}^4 N_k}{\sum_{k=1}^4 N_k + n_k}$$

Nachfolgend werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Viabilitäten aus den einzelnen Versuchen bestimmt.

5.10.2 Bestimmung des Zellwachstums mittels Sulforhodamin B (SRB)-Assay

Der wachstumshemmende Einfluss von Testsubstanzen auf Zellen lässt sich mithilfe des Sulforhodamin B (SRB)-Assays bestimmen. Das Prinzip beruht auf der Anfärbung des Lebendproteins durch den Farbstoff SRB (siehe Abb. 5.5), der unter mild sauren Bedingungen an basische Aminosäuren der Zellproteine bindet. Nach Entfernung des überschüssigen Farbstoffs kann durch Verschieben des pH-Wertes ins Basische (pH ~ 10) der gebundene Farbstoff in Lösung gebracht und dessen Intensität fotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden [Skehan et al., 1990].

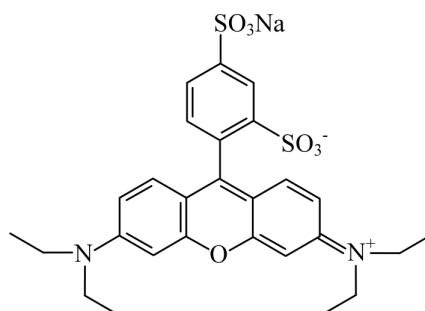


Abbildung 5.5: Struktur von Sulforhodamin B (SRB).

5.10.2.1 Reagenzien

Trichloressigsäure (TCA):	50 % (w/v)	in H ₂ O	
Essigsäurelösung:	1 % (v/v)	in H ₂ O	
SRB-Reagenz:	0,4 % (w/v)	in 1%-iger Essigsäurelösung	
TRIS-Base:	TRIS	10 mM	(1,21 g/l)
In H ₂ O _{bidest} lösen, mit HCl auf pH 10 einstellen.			

5.10.2.2 Durchführung

- Abhängig von der anschließenden Inkubationsdauer 30.000 (24 h), 20.000 (48 h) bzw. 8.000 (72 h) Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte austreuen und 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 1 ml Zellkulturmedium pro Loch.
- Substanzinkubation mit 444 µl (SWCNT) und 1000 µl (Pt) der in den Abschnitten 5.7.1 und 5.7.2 aufgeführten Konzentrationen für 24 h, 48 h oder 72 h durchführen.
- Durch Zugabe von 100 µl TCA die Substanzinkubation mittels Ausfällung der Proteine stoppen.
- Zellen mind. 1 h bei 4 °C belassen, wodurch alle noch lebenden Zellen am Plattenboden fixiert werden.
- Zellen vorsichtig 4 x unter schwach fließendem H₂O zur Entfernung von Zellresten und überschüssigem Medium waschen und anschließend trocknen.
- Fixierte Zellen mit 250 µl SRB-Reagenz pro Loch anfärben. Lochplatte für mind. 30 min im Dunkeln belassen.
- Überschüssigen Farbstoff durch je vierfaches Waschen mit Essigsäurelösung entfernen.
- Nach dem Trocknen der Platte den Farbstoff durch Zugabe von soviel TRIS-Base lösen, dass die Absorption der Lösungsmittelkontrolle bei der anschließenden fotometrischen Messung im linearen Bereich (0,8 - 2,0) liegt. Vor der Messung Platte 5 min schütteln.
- Proben gegen TRIS-Base (Blindwert) mittels Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellen-

länge von 570 nm messen.

5.10.2.3 Auswertung

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf das Wachstum von HT29-Zellen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontroll- und Testwerte berechnet. Die Berechnung des Zellwachstums in Prozent erfolgt in Bezug zu den jeweiligen Kontrollen (β -CD (Pt); NaC (SWCNT)). Der IC_{50} -Wert bezeichnet die Testsubstanzkonzentration, bei der die Wachstumsrate 50 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beträgt. Die zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes benötigten Formeln sind im Formelverzeichnis aufgeführt.

5.10.3 Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivität mittels WST-1-Assay

Die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen wird zur Viabilitätsbestimmung von Zellen herangezogen und kann mittels WST-1-Assay kolorimetrisch erfasst werden. Hierbei wird das schwach rötliche 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien durch Dehydrogenasen in einer NADH-abhängigen Reaktion reduziert (siehe Abb. 5.6). Es wird ein dunkelroter Formazan-Farbstoff gebildet, dessen fotometrische Messung bei 450 nm im Mikrotiterplattenlesegerät erfolgt. Die Intensität der Rotfärbung korreliert mit der Aktivität der Dehydrogenasen und gibt somit Aufschluss über die Menge vitaler Zellen und damit auch über den Proliferationsstatus.

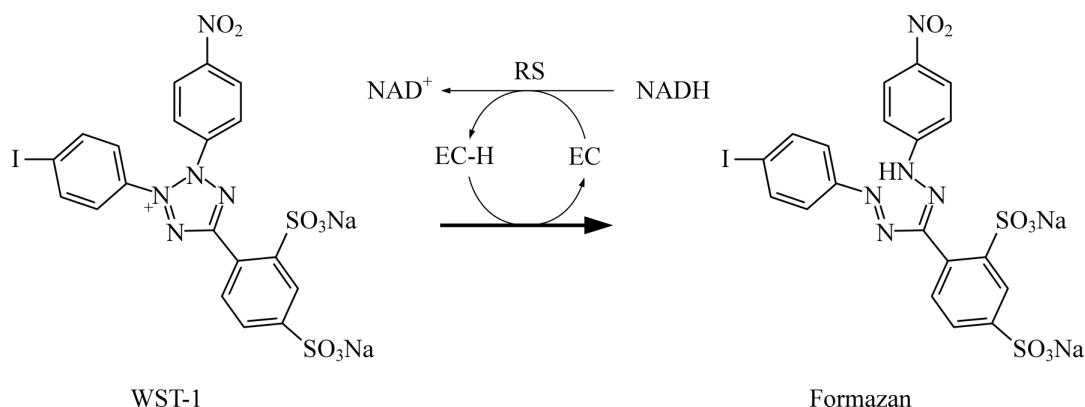


Abbildung 5.6: Reaktionsschema zum WST-1-Assay: Umwandlung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) zu dunkelrot gefärbtem Formazan. EC, Elektronenakzeptor; RS, mitochondrielles Succinat-Tetrazolium-Reduktase System.

5.10.3.1 Reagenzien

WST-1, Roche Applied Science, Mannheim (gebrauchsfertige Lösung).

5.10.3.2 Durchführung

- 10.000 Zellen pro Loch in eine 96-Lochplatte ausstreuen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte 48 h anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 100 µl Zellkulturmedium pro Loch.
- Substanzinkubation mit 80 µl (SWCNT) und 100 µl (Pt) der in den Abschnitten 5.7.1 und 5.7.2 aufgeführten Konzentrationen für 24 h durchführen. Mit Quercetin (500 µM) behandelte Zellen dienen als Positivkontrolle.
- Nach Ablauf der Inkubationsdauer das Medium mit einer sterilen Kanüle absaugen und durch 100 µl frisches Zellkulturmedium ersetzen (um Interaktion von Substanz und Farbstoff zu verhindern).
- 10 µl WST-1-Reagenz zugeben und anschließend für mind. 30 min (je nach Linearitätsbereich des Mikrotiterplattenlesegeräts) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte inkubieren.
- Im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 633$ nm) messen.

5.10.3.3 Auswertung

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen in HT29-Zellen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontroll- und Testwerte berechnet. Die Mittelwerte der Proben und der Positivkontrolle werden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollen (β -CD (Pt); NaC (SWCNT); DMSO 1 % (Quercetin)) bezogen. Die mitochondrielle Aktivität ist in Prozent angegeben.

5.10.4 Bestimmung der Membranintegrität mittels Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay

Die Membranintegrität von Zellen kann mithilfe des LDH (Laktatdehydrogenase)-Assays, einem *in vitro* Zytotoxizitätstest, bestimmt werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der enzymatischen Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturmediumüberstand. Eine Schädigung der Zellmembran führt zur Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile, darunter Enzyme, in das Zellkulturmedium. Diese werden, mit Ausnahme der LDH, jedoch schnell abgebaut. LDH bleibt auch außerhalb der Zelle stabil, so dass die Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturmediumüberstand ein Maß für die Membranintegrität und damit Zellviabilität darstellt [Decker und Lohmann-Matthes, 1988].

Im ersten Schritt der enzymatischen Bestimmung nachfolgend zur LDH-katalysierten Reaktion von Laktat zu Pyruvat wird Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) in die reduzierte Form (NADH/H⁺) überführt. Im zweiten Schritt transferiert der im Testsystem enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff von NADH/H⁺ auf das schwach gelbe Tetrazolium-Salz 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT), das dadurch zu rot gefärbtem

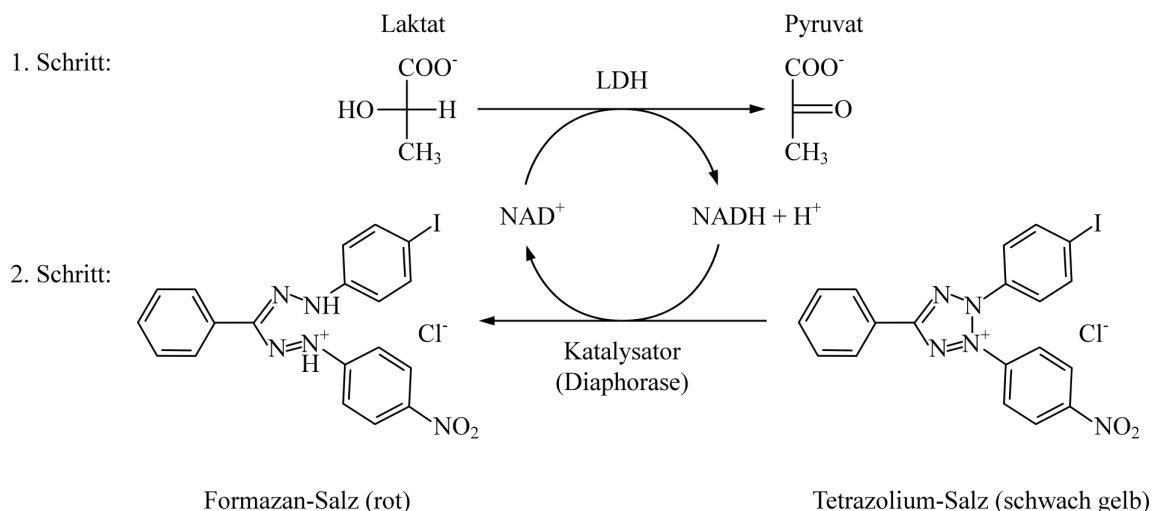


Abbildung 5.7: Reaktionsschema zum Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay: Im ersten Schritt der enzymatischen Bestimmung wird in einer LDH-katalysierten Reaktion von Laktat zu Pyruvat Nikotinamadenindinukleotid (NAD⁺) in die reduzierte Form (NADH/H⁺) überführt. Der Wasserstoff des NADH/H⁺ wird im zweiten Schritt durch den Katalysator Diaphorase auf das schwach gelbe Tetrazolium-Salz transferiert, das dadurch zu rot gefärbtem Formazan reduziert wird.

Formazan reduziert wird (Abb. 5.7). Ein Anstieg der Enzymaktivität im Überstand korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan und der Anzahl geschädigter Zellen. Formazan ist wasserlöslich und kann im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch gemessen werden.

5.10.4.1 Reagenzien

Triton X-100:	1 % (v/v) in H ₂ O
PBS:	siehe Abschnitt 5.6.2.1
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Applied Science, Mannheim

Der Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Roche enthält den Katalysator (Diaphorase/-NAD⁺-Mix) in Form eines Lyophilisats und die Farbstofflösung (2-(4-Iodophenyl)3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT)).

- Die Lyophilisate des Katalysators in je 1 ml H₂O_{bidest} lösen. Die Farbstofflösungen sind gebrauchsfertig. Beide Lösungen sind bei 2 - 8 °C mehrere Wochen haltbar.
- Der Reagenzmix setzt sich aus beiden Lösungen zusammen und wird kurz vor Gebrauch zubereitet. Für 100 Testansätze 250 µl Katalysatorlösung mit 11,25 ml Farbstofflösung mischen.

5.10.4.2 Durchführung

- 40.000 Zellen pro Loch in eine 96-Lochplatte ausstreuen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte 48 h anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 100 µl Zellkulturmedium pro Loch.
- Zellen 2 x mit 1 % FKS-haltigem Zellkulturmedium waschen, da Wachstumssera bereits LDH beinhalten und höhere FKS-Zusätze die Messergebnisse verfälschen könnten.
- Substanzinkubation mit 80 µl (SWCNT) und 100 µl (Pt) der in den Abschnitten 5.7.1 und 5.7.2 aufgeführten Konzentrationen für 24 h in 1 % FKS-haltigem Medium durchführen. Mit Triton X-100 lysierte Zellen dienen als Positivkontrolle.
- Nach Ablauf der Inkubationsdauer 50 µl des Überstands entnehmen und in eine zweite 96-Lochplatte überführen, in der bereits 50 µl PBS pro Loch vorgelegt sind.
- Zu den 100 µl des verdünnten Überstands 100 µl frisch zubereiteten Reagenzmix pipettieren.
- Im Mikrotiterplattenlesegerät 60 s schütteln. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 495 nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 633$ nm).

5.10.4.3 Auswertung

Um den Einfluss der SWCNT auf die Integrität der Membran in HT29-Zellen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontroll- und Testwerte berechnet. Die Mittelwerte der Proben und der Positivkontrolle werden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollen (β -CD (Pt); NaC (SWCNT); Medium (Triton X-100)) bezogen. Die Integrität der Membran nach Partikelinkubation ist als Zytotoxizität in Prozent angegeben.

5.11 Untersuchungen zur Modulation des zellulären Redoxstatus

Der Redoxstatus einer Zelle bezeichnet das Verhältnis zwischen schädlichen Oxidantien, z. B. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und schützenden Antioxidantien, z. B. Glutathion (GSH). Durch Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und des zellulären Glutathion (GSH)-Gehaltes können Rückschlüsse über den Redoxstatus einer Zelle sowie dessen Beeinflussung gezogen werden. Ergänzend wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NF-E2)-Related Factor 2“ (Nrf2) untersucht. Die dafür eingesetzten Methoden werden nachfolgend beschrieben.

5.11.1 Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mittels 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF)-Assay

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kann unter Verwendung des 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF)-Assays nachgewiesen werden. Das Prinzip beruht auf der Umwandlung des nicht-fluoreszierenden Farbstoffs 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) zu fluoreszierendem DCF

(siehe Abb. 5.8). Aufgrund seiner Lipophilie diffundiert DCFH-DA durch die Zellmembran hindurch und wird in der Zelle durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert, wodurch die Polarität zunimmt und der Farbstoff in der Zelle fixiert wird. In Gegenwart von ROS wird der Farbstoff zu DCF oxidiert [Kooy et al., 1997; LeBel et al., 1992; Myhre et al., 2003]. Die Messung der Fluoreszenzzunahme mit der Zeit erfolgt bei einer Wellenlänge 525 nm (Anregung: 485 nm).

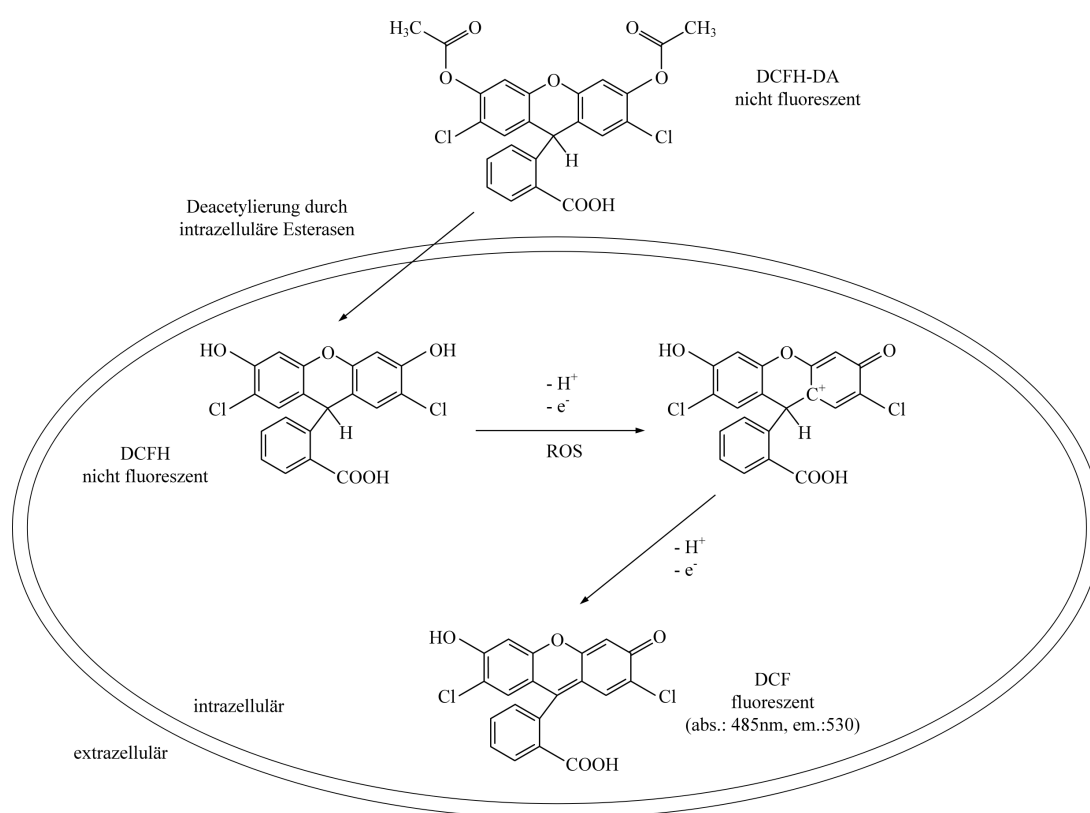


Abbildung 5.8: Prinzip des Dichlorofluorescein (DCF)-Assay. DCF, 2',7'-Dichlorofluorescein; DCFH, 2',7'-Dichlorofluorescein; DCFH-DA, 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat; ROS, reaktive Sauerstoffspezies [modifiziert nach Marchesi et al., 1999].

5.11.1.1 Reagenzien

PBS:	siehe Abschnitt 5.6.2.1		
DCFH-DA-Stammlösung:	DCFH-DA	10 mM	(4,89 g/l)
	In DMSO Zum Schutz vor Licht schwarze Reaktionsgefäße verwenden!		
DCFH-DA-Gebrauchslösung:	DCFH-DA-Stammlösung 1:200 mit PBS verdünnen. Vor Licht schützen!		
farbloses DMEM:	+ 4,5 g/l Glukose + L(–) Glutamin – Pyruvat – Phenolrot		

5.11.1.2 Durchführung

- 40.000 Zellen pro Loch einer schwarzen 96-Lochplatte ausstreuen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte 48 h anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 100 µl Zellkulturmedium pro Loch.
- Zellkulturmedium mit einer sterilen Kanüle vorsichtig absaugen. Die äußeren Löcher für den Test nicht verwenden; daher das Medium dort nicht absaugen.
- Jedes Loch mit 100 µl PBS waschen.

Da die Verwendung des lichtempfindlichen DCFH-DA folgt, alle weiteren Schritte im Halbdunkeln ausführen.

- 100 µl DCFH-DA-Gebrauchslösung pro Loch zugeben und für 30 min bei 37 °C inkubieren.
- 2 x pro Loch mit 100 µl PBS waschen, um von den Zellen nicht aufgenommenes DCFH-DA zu entfernen. Danach die Substanzinkubation mit 80 µl (SWCNT) und 100 µl (Pt) der in Abschnitten 5.7.1 und 5.7.2 aufgeführten Konzentrationen durchführen. Als Positivkontrolle dient eine 20 µM Menadion-Lösung.
- Platte zur Bestimmung der Grundfluoreszenz sofort nach Aufbringen der Testsubstanzen im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 530 nm messen (Blindwert).
- Zellen mit den Testsubstanzen für 3 h bei 37 °C weiter inkubieren, zur Bestimmung eines Zeitverlaufs aber zwischendurch jeweils nach 1, 2 und 3 h im Mikrotiterplattenlesegerät messen.

5.11.1.3 Auswertung

Um den Einfluss der Testpartikel auf den intrazellulären Redoxstatus in HT29-Zellen zu bestimmen, wird zunächst die Fluoreszenzzunahme als relative Fluoreszenz („relative fluorescence

units", RFU) durch die Differenzbildung aus den Messwerten nach 0 h und 3 h Inkubationsdauer ermittelt. Anschließend werden die Mittelwerte der Kontroll- und Testwerte berechnet und die Mittelwerte der Proben und der Positivkontrolle auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollen (β -CD (Pt); NaC (SWCNT); DMSO 1 % (Menadion)) normiert. Die Bildung von ROS nach Partikelinkubation ist in Prozent angegeben.

5.11.2 Bestimmung des intrazellulären Gesamt-Glutathion (tGSH)-Gehalts mittels GSH-Assay nach Tietze

GSH ist ein Tripeptid (γ -Glu-Cys-Gly) mit einer freien Thiol-Gruppe und dient als zelluläres Antioxidans zur Abwehr potenziell schädlicher Verbindungen wie RS. Dabei wechselt GSH zwischen reduzierter Thiolform (GSH) und oxidierten Form (GSSG), in der zwei Tripeptide über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind [Berg et al., 2003]. Der GSH-Gehalt, bzw. das Verhältnis GSH/GSSG, gibt Aufschluss über den Redoxstatus der Zelle.

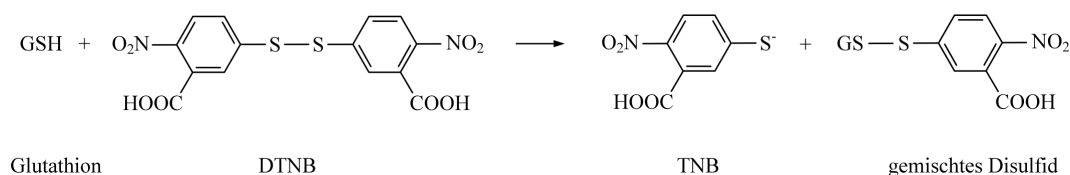


Abbildung 5.9: Umsetzung von Glutathion (GSH) mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) und einem gemischten Disulfid.

Die Bestimmung von GSH beruht auf dessen Umsetzung mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Hierbei reagiert die freie Thiolgruppe des GSH in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit der Disulfidbrücke des DTNB, wodurch 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) freigesetzt wird (siehe Abb. 5.9). TNB besitzt ein Absorptionsmaximum bei 412 nm, sodass dessen Extinktionszunahme fotometrisch gemessen werden kann. Da die Extinktionszunahme aufgrund der stöchiometrischen Umsetzung linear zur Menge des umgesetzten GSH ist, kann mittels linearer Regression eine Standardgerade erstellt werden, anhand derer die GSH-Gehalte berechnet und als nmol Gesamtglutathiongehalt (tGSH) auf mg Protein normiert werden [Ellman, 1959].

Um den tGSH-Gehalt, d.h. die Summe aus GSH und oxidiertem Glutathion (GSSG), zu bestimmen, wird zuvor das vorhandene GSSG durch das Enzym Glutathionreduktase (GR) in einer NADPH-abhängigen Reaktion in GSH überführt. Anschließend erfolgt die Umsetzung mit DTNB [Tietze, 1969] (siehe Abb. 5.10).

Eine Messung des GSSG-Gehalts ist erst nach Eliminierung des in großem Überschuss vorhandenen GSHs möglich. Hierzu wird 2-Vinylpyridin (2-VP) eingesetzt, das mit GSH zu einem stabilen Produkt abreagiert (siehe Abb. 5.11). Analog zur tGSH-Messung wird GSSG nun zu GSH reduziert und mit DTNB umgesetzt. Es ist zu beachten, dass aus einem Äquivalent GSSG zwei Äquivalente GSH entstehen [Griffith, 1980].

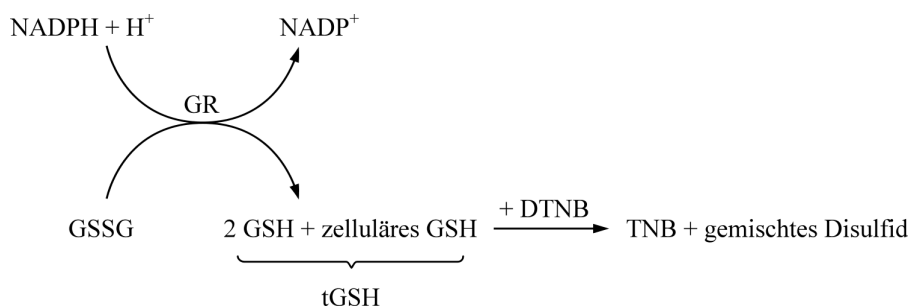


Abbildung 5.10: Schematische Darstellung der Bestimmung des Gesamtglutathion (tGSH)-Gehaltes nach Tietze [1969]. NADPH/H⁺/NADP⁺, reduziertes/oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotid; GR, Glutathionreduktase; GSSG/GSH, oxidiertes/reduziertes Glutathion; DTNB, 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure); TNB, 5-Thio-2-nitrobenzoat.

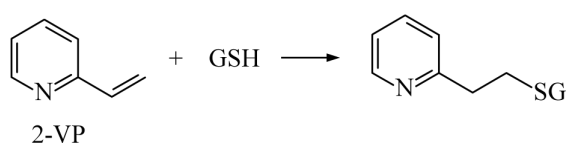


Abbildung 5.11: Umsetzung von reduziertem Glutathion (GSH) mit 2-Vinylpyridin (2-VP).

5.11.2.1 Reagenzien

PBS:	siehe Abschnitt 5.6.2.1		
Trypsin:	siehe Abschnitt 5.6.2.1		
DMEM:	10 % FKS,	1 % P/S und	
	0 % FKS,	1 % P/S	
Puffer A:	KH ₂ PO ₄	125 mM	(17 g/l)
	EDTA	8 mM	(2,34 g/l)
Puffer B:	K ₂ HPO ₄	125 mM	(21,8 g/l)
	EDTA	8 mM	(2,34 g/l)
A/B-Puffer:	Puffer A	15 ml	
	Puffer B	85 ml	
	Lösung immer frisch ansetzen		
Sulfosalicylsäure („sulfosalicylic acid”, SSA)-Lösung:	5 % (w/v) in H ₂ O und 10 % (w/v) in H ₂ O		

GSH-Stammlösung:	GSH	1 mM	
		• 30,73 mg GSH in 1 ml H₂O lösen (100 mM). • 200 µl der 100 mM Lösung in 19,8 ml 5 %-iger SSA lösen (Verd. 1:100, 1 mM).	
		1 ml Aliquote bei –80 °C aufbewahren.	
GSH-Standardlösungen:	Konzentrationsbereich 0 - 200 µM Verdünnungen der 1 mM GSH-Stammlösung mit 5 %-iger SSA jedes Mal frisch herstellen.		
GSSG-Stammlösung:	GSSG	1 mM	
		• 61,27 mg GSSG in 1 ml H₂O lösen (100 mM). • 200 µl der 100 mM Lösung in 19,8 ml 5 %-iger SSA lösen (Verd. 1:100, 1 mM).	
		1 ml Aliquote bei –80 °C aufbewahren.	
GSSG-Standardlösungen:	Konzentrationsbereich 0 - 20 µM 1mM GSSG-Stammlösung mit 5 %-iger SSA 1:10 verdünnen (100 µM). Verdünnungen der 100 µM GSSG-Lösung mit 5 %-iger SSA jedes Mal frisch herstellen.		
Triethanolamin (TEA):	TEA	50 % (v/v)	in H ₂ O
NaHCO ₃ -Lösung:	0,5 % (w/v)	in H ₂ O	
DTNB-Lösung:	DTNB	6 mM	
		11,9 mg in 5 ml A/B-Puffer lösen; immer frisch ansetzen.	
GR-Lösung:	GR	50 U/ml	
		Glutathionreduktase (GR) aus Hefe mit einer Aktivität von 168 U/ml wird mit A/B-Puffer auf 50 U/ml verdünnt. Die Lösung ist stets frisch anzusetzen.	
NADPH-Lösung:	NADPH	20 mM	
	16,7 mg/ml in 0,5 %-iger NaHCO ₃ -Lösung gelöst.		

tGSH-Reagenzmix:	A/B-Puffer	164 µl
	DTNB-Lösung	20 µl
	NADPH-Lösung	4 µl
	GR (50 U/ml)	2 µl
	Angaben pro Loch einer 96-Lochplatte. Reagenzmix erst unmittelbar vor der Messung ansetzen.	
GSSG-Reagenzmix:	A/B-Puffer	154 µl
	DTNB-Lösung	20 µl
	NADPH-Lösung	4 µl
	GR (50 U/ml)	2 µl
	Angaben pro Loch einer 96-Lochplatte. Reagenzmix erst unmittelbar vor der Messung ansetzen.	

Alle Lösungen, die nicht frisch angesetzt werden müssen, können bei 4 °C aufbewahrt werden.

5.11.2.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Abhängig von der anschließenden Inkubationsdauer zwischen 1,2 Mio (24 h) und 1,6 Mio (3 h) Zellen pro Gewebekulturschale (Ø 10 cm) ausstreuen und 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 10 ml Zellkulturmedium pro Gewebekulturschale.
- Substanzinkubation mit 13,55 ml (SWCNT) und 10 ml (Pt) der in den Abschnitten 5.7.1 und 5.7.2 aufgeführten Konzentrationen für 24 h durchführen. Eine 1 mM BSO-Lösung dient als Positivkontrolle.

Zellaufarbeitung

- Nach Ablauf der Inkubationszeit Medium abgießen und zur Entfernung von Partikelresten 2 x mit je 5 ml eiskaltem PBS waschen.
- Zellen mit 1 ml Trypsin für 100 s bei 37 °C im Brutschrank inkubieren.
- Trypsin durch Zugabe von 1 ml 10 % FKS-haltigem Zellkulturmedium inaktivieren.
- Zellsuspension nach mehrmaligem Abspülen des Plattenbodens in ein eisgekühltes 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführen. Plattenboden 2 x mit je 1 ml 0 % FKS-haltigem Zellkulturmedium nachspülen und mit der vorherigen Fraktion vereinigen.

- Viabilitätsbestimmung nach Anfärben eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblau, wie in Abschnitt 5.6.2.6 beschrieben, durchführen. Die Viabilität sollte nicht weniger als 80 % betragen.
- 15 ml-Röhrchen bei 1600 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, das Zellpellet mit 1 ml A/B-Puffer resuspendieren und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführen. 15 ml-Röhrchen 3 x mit je 200 µl A/B-Puffer nachspülen und mit der vorherigen Fraktion vereinigen.
- Zentrifugation der 2 ml-Reaktionsgefäße bei 1600 rpm und 4 °C für 10 min.
- Überstand verwerfen, das Zellpellet mit 370 µl A/B-Puffer resuspendieren und gut durchmischen.
- Von der Zellsuspension 2 x 10 µl für die Proteinbestimmung nach Abschnitt 5.9.2 entnehmen und in 90 µl A/B-Puffer überführen (Verd. 1:10), welcher in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt ist.
- Die übrige Zellsuspension (350 µl) mit 350 µl 10 %-iger SSA versetzen, mischen und zur Ausfällung der Proteine 15 min auf Eis stehen lassen.
- Bei max. Umdrehungszahl und 4 °C für 10 min zentrifugieren.

Nach Ausfällung der Proteine können die Proben bis zur Messung max. 4 Wochen bei -80 °C aufbewahrt werden.

tGSH-Messung

- Ausgehend von der 1 mM GSH-Stammlösung eine Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0 - 200 µM durch Verdünnung mit 5 %-iger SSA herstellen. Standardreihe jeweils frisch ansetzen.
- Jeweils 10 µl des Überstands, der GSH-Standardreihe sowie des Blindwerts (5 %-ige SSA) in eine 96-Lochplatte jeweils als Duplikat pipettieren und mit 190 µl frisch angesetztem tGSH-Reagenzmix versetzen. Reagenzmix mit einer Mehrkanalpipette in die 96-Lochplatte pipettieren.
- 96-Lochplatte unmittelbar im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm messen, da die Reaktion sofort nach Zugabe des tGSH-Reagenzmixes startet. Vor der Messung Platte im Mikrotiterplattenlesegerät 30 s lang schütteln.
- Zur Bestimmung der temporären Extinktionszunahme 96-Lochplatte nach 2 min erneut messen.

GSSG-Messung

- Zur Eliminierung des zellulären GSHs 500 µl des Überstands mit 20 µl 2-VP und 100 µl 50 %-iger TEA versetzen und im Thermomixer bei 900 rpm und 26 °C für 1 h umsetzen.
- 1 mM GSSG-Stammlösung mit 5 %-iger SSA 10-fach verdünnen (100 µM). Ausgehend von dieser 100 µM GSSG-Lösung eine Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0 - 20 µM durch Verdünnung mit 5 %-iger SSA herstellen. Standardreihe jeweils frisch ansetzen.

- Jeweils 20 µl des derivatisierten Überstands, der GSSG-Standardreihe sowie des Blindwerts (5 %-ige SSA) als Duplikat in eine 96-Lochplatte pipettieren und mit 180 µl frisch angesetztem GSSG-Reagenzmix versetzen.
- 96-Lochplatte unmittelbar im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm messen, da die Reaktion sofort nach Zugabe des tGSH-Reagenzmixes startet. Vor der Messung Platte im Mikrotiterplattenlesegerät 30 s lang schütteln.
- Zur Bestimmung der temporären Extinktionszunahme 96-Lochplatte nach 10 min erneut messen.

5.11.2.3 Auswertung

Die Messwerte der Doppelbestimmung werden gemittelt. Anschließend werden die gemittelten Extinktionen der ersten Messung (E1) von den gemittelten Extinktionen der zweiten Messung (E2) subtrahiert und durch die Minutenanzahl dividiert, woraus sich die Extinktionszunahme pro Minute ergibt. Aus den Extinktionszunahmen pro Minute der Standardlösungen wird eine Standardgerade erstellt, aus der nach linearer Regression eine Geradengleichung erhalten wird. Hieraus kann aus den gemessenen Extinktionen der Proben der tGSH-Gehalt bzw. GSSG-Gehalt ermittelt werden. Der Gehalt an tGSH und GSSG wird auf die Proteinmenge der Probe bezogen und in nmol GSH/mg Protein angegeben. Der Gehalt an GSH errechnet sich aus der Differenz zwischen dem tGSH- und dem GSSG-Gehalt.

5.11.3 Bestimmung der Nrf2-Translokation in den Zellkern mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (disk. SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

Für Untersuchungen zur Modulation der nukleären Translokation von Nrf2 werden die mit den Testpartikeln behandelten HT29-Zellen durch stufenweise Aufarbeitung in eine Zytosol- und eine Kernfraktion getrennt. Anschließend wird der Proteingehalt beider Fraktionen nach Bradford (1976) bestimmt (siehe Abschnitt 5.9.1) und die Proteine mittels disk. SDS-PAGE getrennt. Bei diesem Trennverfahren wird das gewonnene Protein zunächst mithilfe des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, siehe Abb. 5.12) und β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken spaltet, denaturiert, um den Einfluss der Proteinfaltung bei der elektrophoretischen Proteintrennung zu unterbinden. Das Detergens lagert sich mit der hydrophoben Seite in einem Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1,0 g Protein an das Polypeptidrückgrat an. Durch die im Überschuss vorhandene negative Ladung der angelagerten SDS-Moleküle wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, woraus ein konstantes Verhältnis von Ladungsmenge zu Molekülgröße resultiert.

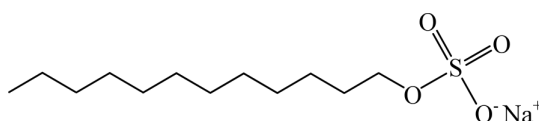


Abbildung 5.12: Struktur von Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“, SDS).

Nach erfolgter Denaturierung wird die Proteinsuspension auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Da die Masse eines denaturierten Proteins proportional zu seinem hydrodynamischen Radius ist, haben unterschiedlich große Proteine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten und können so im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Sie erfahren demnach im elektrischen Feld alle die gleiche Beschleunigung, werden aber vom Gel größenabhängig gebremst, so dass sich kleinere Moleküle schneller durch das Gel bewegen als größere. Die Trennung erfolgt somit ausschließlich nach der Größe der Proteine. Anhand eines mitgeführten Molekulargewichtstandards können die zu charakterisierenden Proteine identifiziert werden.

Da Proteine im Polyacrylamidgel nicht immunologisch detektiert werden können, werden sie elektrophoretisch mithilfe des „semi-dry Blot“ und „Trans-Blot“ Verfahrens auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran übertragen. Hierbei können kleine Moleküle die Poren der Membran passieren, während große Moleküle wie Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen zurückgehalten werden.

Die Detektion der zu charakterisierenden Proteine erfolgt immunologisch. Nach Bindung des spezifisch gegen das Zielprotein gerichteten Primärantikörpers erfolgt die Bindung des Sekundärantikörpers. Dieser ist gegen den Primärantikörper gerichtet und an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, „Horseradish“ Peroxidase) gekoppelt. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol durch H_2O_2 . Die durch diese Reaktion hervorgerufene Chemolumineszenz kann gemessen und somit zur Auswertung herangezogen werden [Leong et al., 1986]. Auf diese Weise wird Nrf2 nach Hybridisierung mit einem spezifischen Antikörper identifiziert und seine Verteilung im zytosolischen und nukleären Kompartiment semiquantitativ erfasst.

5.11.3.1 Reagenzien

Reagenzien für die Zellaufarbeitung:			
PBS:	siehe Abschnitt 5.6.2.1		
Puffer A:	HEPES (pH 7,9)	10 mM	(2,383 g/l)
	KCl	10 mM	(0,746 g/l)
	EDTA	0,1 mM	(0,0372 g/l)
	EGTA	0,1 mM	(0,038 g/l)
	In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen (100 ml ansetzen).		
Direkt vor Gebrauch zugeben:	DTT	1 % (v/v)	
	Proteaseinhibitor-Mix	4 % (v/v)	

Puffer B:	HEPES (pH 7,9)	20 mM	(4,766 g/l)
	NaCl	400 mM	(23,0 g/l)
	EDTA	1 mM	(0,372 g/l)
	EGTA	1 mM	(0,38 g/l)
	In H ₂ O _{bidest} lösen (100 ml ansetzen).		
Direkt vor Gebrauch zugeben:	DTT	1 % (v/v)	
	Proteaseinhibitor-Mix	4 % (v/v)	
Reagenzien für die disk. SDS-Page:			
TRIS/HCl (pH 8,8):	1,5 M	(182 g/l)	
(Trenngel)	In H ₂ O _{bidest} lösen und pH 8,8 einstellen (100 ml ansetzen).		
TRIS/HCl (pH 6,8):	0,5 M	(60,6 g/l)	
(Sammelgel)	In H ₂ O _{bidest} lösen und pH 6,8 einstellen (100 ml ansetzen).		
Acrylamid-Lösung:	30 % (v/v), Acrylamid/Bisacrylamid = 37,5:1		
Ammoniumperoxosulfat (APS)-Lösung:	10 % (w/v)	in H ₂ O _{bidest}	
SDS-Lösung:	10 % (w/v)	in H ₂ O _{bidest}	
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED):			
6 x SDS-Probenpuffer:	TRIS/HCl (pH 6,8)	0,5 M	50 ml
	Glycerol		40 ml
	SDS		1,24 g
	Bromphenolblau		0,16 g
	β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)	
	Mit H ₂ O _{bidest} auf 100ml auffüllen, zu 1 ml aliquotieren und im Kühlschrank aufbewahren, vor Gebrauch mit 52,6 µl β-Mercaptoethanol versetzen.		

10 x SDS-Laufpuffer:	Glycin	2 M	(150 g/l)
	TRIS/HCl (pH 8,3)	250 mM	(30,29 g/l)
	SDS	1 % (w/v)	(10 g/l)
	Mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen, pH 8,3 einstellen. Für Gebrauch 1:10 verdünnen.		
Reagenzien für den Western Blot:			
2 x Blottingpuffer:	Glycin	78 mM	(5,85 g/l)
	TRIS/HCl (pH 8,3)	96 mM	(11,65 g/l)
	SDS	0,074 % (w/v)	(0,74 g/l)
	Methanol	40 % (v/v)	400 ml
	Mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen. Für Gebrauch 1:2 verdünnen.		
20 x TBS-Puffer:	NaCl	2,6 M	(152 g/l)
	TRIS/HCl (pH 7,6)	0,4 M	(48,5 g/l)
	Mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen, pH 7,6 einstellen. Für Gebrauch 1:20 verdünnen.		
Blockingreagenz:	BSA	5 % (w/v)	
	Tween 20	0,1 % (v/v)	
	In 1 x TBS-Puffer lösen.		
Waschpuffer:	Tween 20	0,3 % (v/v) in	1 x TBS
Primärantikörper	Nrf2(H-300)-Antikörper (rabbit, Santa Cruz), 1:200 in Blockingpuffer verdünnen.		
	Lamin B-Antikörper (goat, Santa Cruz), 1:200 in Blockingpuffer verdünnen.		
	α -Tubulin-Antikörper (mouse, Santa Cruz), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen.		

Sekundärantikörper	Goat anti-rabbit IgG-HRP-Antikörper (New England Biolabs), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen. Mouse anti-goat IgG-HRP-Antikörper (Santa Cruz), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen. Goat anti-mouse IgG-HRP-Antikörper (Santa Cruz), 1:2500 in Blockingpuffer verdünnen.
--------------------	--

5.11.3.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit den Testsubstanzen

- $4,5 \times 10^6$ Zellen pro Gewebekulturschale ($\varnothing$ 15 cm) ausstreuen und 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 20 ml Zellkulturmedium pro Gewebekulturschale. Zur Versuchsdurchführung sollten die Zellen eine Konfluenz von 70 bis 80 % aufweisen.
- Substanzinkubation mit 35,51 ml (SWCNT) der in Abschnitt 5.7.1 aufgeführten Konzentrationen durchführen. Menadion (MEN, 20 µM) dient als Positivkontrolle.

Gewinnung der Zellproteine Die folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

- Medium entfernen und Zellen 2 x mit je 5 ml eiskaltem PBS waschen. Beim zweiten Waschschritt PBS-Rückstände sorgfältig abpipettieren.
- Je Gewebekulturschale 700 µl PBS aufgeben und Zellen mithilfe eines Zellschabers ablösen.
- Zellsuspension anschließend 5 min bei 800 x *g* und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Zellpellet in 200 µl kaltem Puffer A resuspendieren und 15 min auf Eis inkubieren.
- 17 µl Nonidet P40 zugeben und gut vortexen.
- Zellsuspension anschließend 10 min bei 800 x *g* und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand als zytosolische Fraktion auf Eis lagern. Zellpellet in 65 µl Puffer B resuspendieren, 15 min auf Eis inkubieren, alle 2 min vortexen.
- Suspension bei 20.000 x *g* für 10 min (4 °C) zentrifugieren. Der Überstand entspricht dem Kernextrakt und wird ebenfalls bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.
- Proben mit H₂O_{bidest} 1:10 verdünnen und Protein-Bestimmung nach Bradford durchführen (siehe Abschnitt 5.9.1).
- Proteingehalt jeder Probe auf 360 µg/ml einstellen und mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzen.
- Proben 5 min bei 950 rpm und 95 °C im „Thermocycler“ denaturieren.

Auftrennung der Proteine mittels disk. SDS-PAGE Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels disk. SDS-PAGE in einem vertikalen Doppelgelelektrophoresesystem nach Laemmli (Perfect-Blue™, vertikale Doppelsystem Twin S, Peqlab).

Hierzu werden Glasplatten entsprechend der Anleitung im Gießstand fixiert und dienen im Folgenden als Wände in der Kathodenpufferkammer. Zur Proteintrennung werden entsprechend dem Molekulargewicht (MG) der Proteine Trenngele mit unterschiedlichem Polyacrylamidanteil (AA) verwendet (siehe Tab. 5.6).

Tabelle 5.6: Molekulargewichte der zu charakterisierenden Proteine sowie der jeweils benötigte Polyacrylamidanteil der verwendeten Trenngele.

Zu charakterisierendes Protein	MG [kDa]	Polyacrylamidanteil im Trenngel [%]
Nrf2	66	10
α -Tubulin	54	12
Lamin B	67	12

Beim Sammelgel handelt es sich stets um ein 4 %-iges Acrylamidgel. Die Pipettierschemata für Trenngele mit Polyacrylamidgelanteilen von 10 % und 12 % sowie das Pipettierschema für das Sammelgel sind in Tabelle 5.7 dargestellt. Die angegebenen Trenngelvolumina reichen für je ein Trenngel mit den Maßen 8,5 cm x 5,8 cm x 0,8 mm (BxHxT). Neben $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, TRIS-Lösung, Acrylamid (Rotiphorese (37,5:1)-Lösung) und 10%-iger SDS-Lösung werden zum Gießen der Gele Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Stabilisator eingesetzt.

Tabelle 5.7: Pipettierschemata der Trenngele und des Sammelgels mit unterschiedlichen Acrylamidanteilen.

Komponenten	Trenngele		Sammelgel
	12 % AA	10 % AA	4 % AA
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ [ml]	1,72	2,05	1,2
1,5 M TRIS (pH 8,8) [ml]	1,23	1,23	—
0,5 M TRIS (pH 6,8) [ml]	—	—	1,23
Rotiphorese-Lösung [ml]	1,97	1,64	1,15
SDS-Lösung (10 %) [μl]	49,2	49,2	49,2
APS-Lösung (10 %) [μl]	24,6	24,6	24,6
TEMED [μl]	2,46	2,46	2,46

Arbeitsschritte

- Glasplatten und Abstandshalter mit 70%-igem Ethanol entfetten und im Gießstand des

Vertikalsystems mithilfe der Feststellschrauben fixieren.

- Trenngel (siehe Tab. 5.7) bis auf eine Höhe von etwa 5 cm (3,5 ml) zwischen die beiden Glasplatten pipettieren und zum Ausschluss von Luftsauerstoff mit n-Butanol überschichten. Das Trenngel benötigt bei RT 45 min zum Auspolymerisieren oder kann über Nacht bei 4 °C gelagert werden.
- Nach vollständiger Polymerisierung des Gels das n-Butanol entfernen und mit H₂O_{bidest} spülen. Wasserreste mit einem Papiertuch entfernen.
- Kamm zur Ausbildung der Probestaschen zwischen die Glasplatten einsetzen und Sammelgel (siehe Abb. 5.13) aufgießen.
- Nach Auspolymerisierung des Sammelgels Kamm vorsichtig entfernen und Gelreste aus Probestaschen mittels Kanüle und Wasserstrahlpumpe absaugen.
- Je 60 µg Gesamtprotein (siehe Abschnitt „Gewinnung der Zellproteine“) pro Geltasche aufgeben.

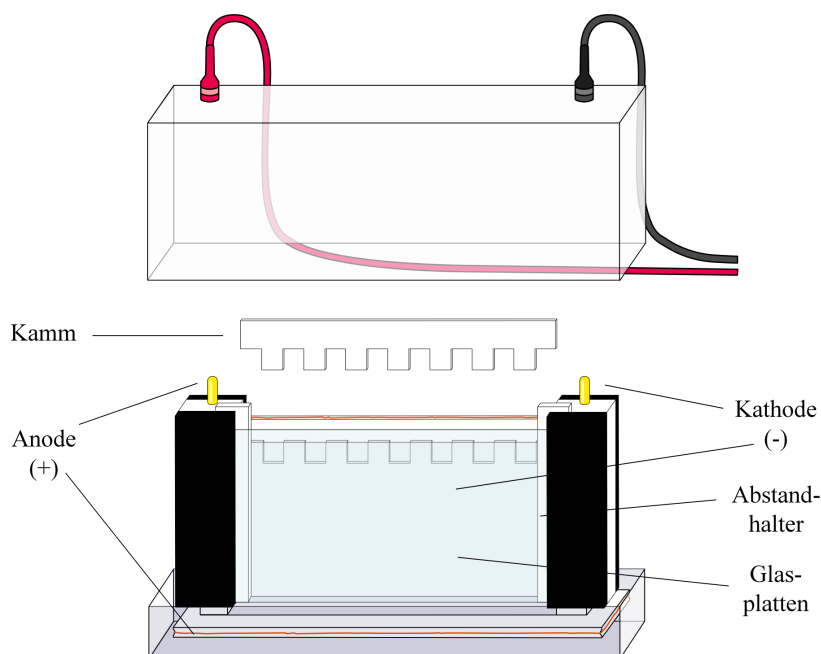


Abbildung 5.13: Schematische Darstellung eines Vertikalsystems.

Um einerseits das Molekulargewicht des zu charakterisierenden Proteins zu bestimmen und zusätzlich der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine zu folgen, wird ein Proteinmolekulargewichtsstandard (Spectra™ Multicolor, Fermentas Life Sciences) mitgeführt.

Die Elektrophorese wird nach Auffüllen der Elektrophoresekammer mit 1 x SDS-Laufpuffer gestartet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wird mit einer Spannung von $U = 100 \text{ V}$ durchgeführt, die jedoch nach dem Übergang der Proteine ins Trenngel auf $U = 140 \text{ V}$ erhöht werden kann.

Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western Blot und Detektion mittels spezifischer Antikörper Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

erfolgt mittels „semi-dry Blot“ sowie „Trans-Blot“ in Anwesenheit von „Blotting-Puffer“. Nachfolgend kann der Gehalt an Nr2 in der Zytosol- und Kernfraktion durch Chemolumineszenz-Detektion erfasst werden. Der Gehalt an α -Tubulin in den jeweiligen Fraktionen wird als Beladungskontrolle mitbestimmt. Im Laufe der Arbeit wurde von der „semi-dry Blot“- zur „Trans-Blot“-Methode übergegangen, da diese reproduzierbarere Blot-Ergebnisse sowie einen höheren Durchsatz gewährleistet.

- Whatman-Papiere und die Nitrozellulosemembran in 1 x Blotting-Puffer äquilibrieren.
- Unter Anwendung der „semi-dry Blot“-Methode drei Whatman-Papiere auf die Anodenseite legen, darauf die Nitrozellulosemembran und das Gel platzieren. Anschließend weitere drei Whatman-Papiere auflegen und mit der Kathodenseite des „semi-dry“ Elektroblo-tters bedecken (siehe Abb. 5.14). Unter Anwendung der „Trans-Blot“-Methode jeweils ein Whatman-Papier verwenden, das „Sandwich“ zwischen zwei Faser-Pads platziert in die Gel-kassette legen und in den „Trans-Blotter“ einhängen. Nachfolgend Blotter mit „Blotting-Puffer“ befüllen, bis die Kassette bedeckt ist (siehe Abb. 5.15). Beim Aufbau des „Sandwich“ aus den Whatman-Papieren, der Nitrozellulosemembran und des Gels ist in beiden Fällen darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten bilden, da dadurch der Proteintransfer verhindert wird.

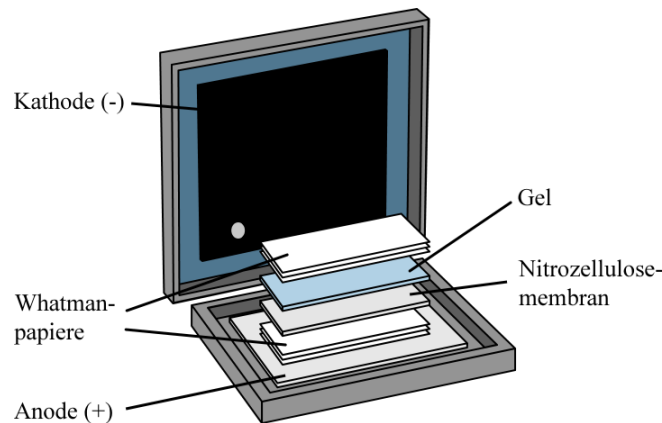


Abbildung 5.14: Darstellung eines „semi-dry“-Blotters (PerfectBlue Semi-dry Elektroblo-tter, Peqlab).

- Proteintransfer bei einer konstanten Stromstärke von $I = 140 \text{ mA}$ pro Gel über 90 min durchführen.
- Im Anschluss an den Proteintransfer die Membran für 1 h bei RT in „Blockingreagenz“ schwenken, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken.
- Nitrozellulosemembran mit dem spezifischen Primärantikörper in entsprechender Verdün-nung (1:200) in „Blockingreagenz“ über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubieren.
- 3 x je 5 min in Waschpuffer waschen.
- Nitrozellulosemembran mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in entsprechen-der Verdünnung (1:2000) in „Blockingreagenz“ für 60 min bei RT im Überkopfschüttler inkubieren.

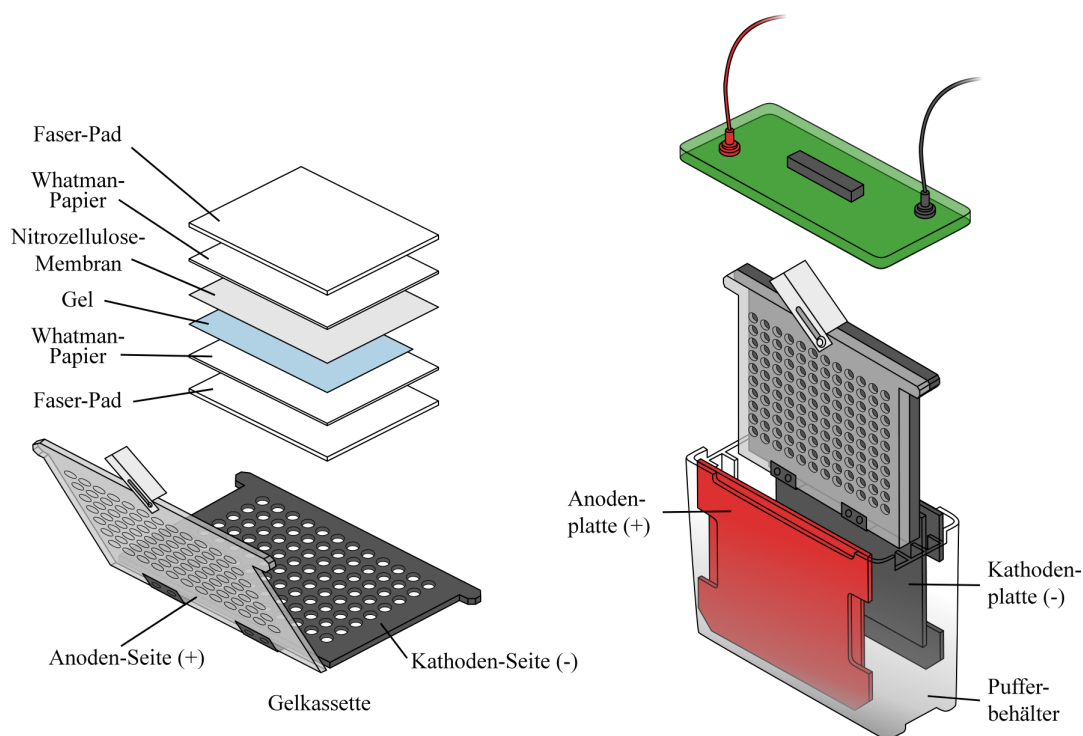


Abbildung 5.15: Darstellung eines „Trans-Blotters“ (Trans-Blot[®] Cell, Bio-Rad).

- 3 x je 5 min in Waschpuffer waschen.
- Mit LumiGlo[®]-Lösung (Roth) für 1 min inkubieren.

Die Detektion erfolgt mittels LAS-4000 (Image Reader, Fujifilm), die Auswertung mittels AIDA Image Analyser Multilabeling-Software (Version 3.52). Die semiquantitative Auswertung wird in Bezug zur Kontrolle (Natriumcholat) als Test over Control (T/C) in [%] errechnet.

5.11.4 Bestimmung der Bildung von Wasserstoffperoxid mittels Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide Assay

Zur Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration im Zellkulturmedium unter Inkubationsbedingungen wird der Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide Assay (Invitrogen) herangezogen. In Gegenwart von Peroxidase („Horseradish“ Peroxidase, HRP) reagiert das Amplex[®] Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydroxy-Phenoxazin, siehe Abb. 5.16) in einer stöchiometrischen Reaktion mit H_2O_2 zum rot fluoreszierenden Oxidationsprodukt Resorufin, welches durch Fluoreszenzemission bei $\lambda = 585$ nm gemessen wird.

5.11.4.1 Reagenzien

Alle eingesetzten Reagenzien sind dem Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide Assay Kit zu entnehmen.

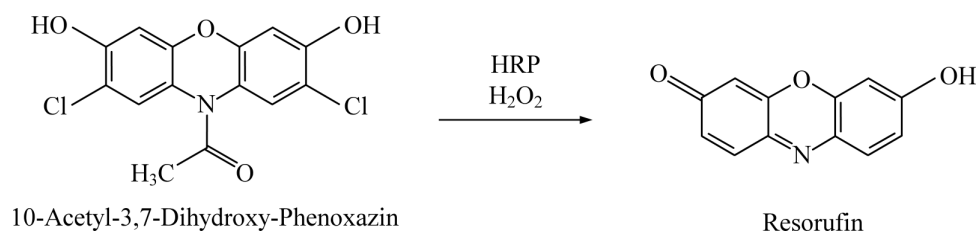


Abbildung 5.16: Fluoreszenzreaktion des Amplex[®] Red Reagenz mit H_2O_2 bei Anwesenheit von HRP zu Resorufin. HRP: Horseradish peroxidase.

5.11.4.2 Durchführung

- 170.000 Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte ausstreuen und bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchte 48 h anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 1000 μl Zellkulturmedium pro Loch.
- Zellkulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig absaugen.
- Jedes Loch mit 1000 μl eines farblosen Mediums waschen.
- Substanzinkubation mit 444 μl (SWCNT) der im Abschnitt 5.7.1 aufgeführten Konzentrationen für 1 h durchführen. Die Inkubation erfolgt im farblosen Zellkulturmedium, da der Indikator Phenolrot die Messung stört.
- Je Platte zusätzlich in die Hälfte der Löcher Katalase (100 U/ml) zugeben.
- Eine Standardreihe im Konzentrationsbereich zwischen 0,125 - 5 μM H_2O_2 mitführen.
- Nach dem Inkubationsende je 2 x 50 μl des Mediumüberstands als Duplikat in eine schwarze 96-Lochplatte überpipettieren. Als Blindwert 50 μl Puffer einsetzen.
- Reaktion durch Zugabe von 50 μl „working solution“ je Loch starten.
- Nach 30 minütiger Inkubation im Dunklen bei RT Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 585 nm mittels Mikrotiterplattenlesegerät messen.

5.11.4.3 Auswertung

Die Berechnung der gebildeten H_2O_2 -Menge erfolgt mittels Microsoft Excel 2007 nach Abzug des Hintergrunds, durch lineare Regression.

5.12 Untersuchungen zum genotoxischen Potential

Das genotoxische Potential der Pt-NP in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers wurde anhand der DNA-strangbrechenden Wirkung in der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) bestimmt.

Zur Beurteilung des genotoxischen Potentials der in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs wurden verschiedene Endpunkte herangezogen: die DNA-strangbrechende Wirkung, gemessen mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay), chromosomale Schädigung durch Induktion von Mikrokernen (Micronuclei (MN)-Test) sowie die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 (Western Blot Analyse).

5.12.1 Bestimmung der DNA-strangbrechenden Wirkung mittels Einzelzellelektrophorese (Comet Assay)

DNA-strangbrechende Eigenschaften von Testsubstanzen können mittels Comet Assay untersucht werden. Die Einzelzellelektrophorese unter neutralen pH-Bedingungen ermöglicht das Detektieren und Messen von Doppelstrangbrüchen der DNA in eukaryotischen Zellen [Oestling und Johanson, 1984].

Durch Variation der Versuchsbedingungen kann der Comet Assay zusätzlich Aufschluss über weitere Arten der DNA-Schädigung geben. Die Durchführung dieser Methode unter alkalischen pH-Bedingungen [Singh et al., 1988] ermöglicht neben der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen auch die Erfassung von DNA-Einzelstrangbrüchen, apurinen und apyrimidinen Stellen (AP-Stellen) sowie DNA/Protein- und DNA/DNA-Quervernetzungen [Tice et al., 2000]. Diese sind alkalilabil, weshalb sie bei Anwendung eines stark alkalischen pH-Werts ($\text{pH} \geq 13$) nach DNA-Entwindung in DNA-Strangbrüche überführt werden [Collins et al., 1997]. Durch Behandlung der lysierten Zellen mit dem aus *E. coli* stammenden Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) können zusätzlich oxidative DNA-Schäden bzw. FPG-sensitive Stellen erfasst werden (siehe Abschnitt 2.7.1).

Die schematische Durchführung des Comet Assays unter alkalischen pH-Bedingungen mit zusätzlicher FPG-Behandlung ist in Abb. 5.17 dargestellt.

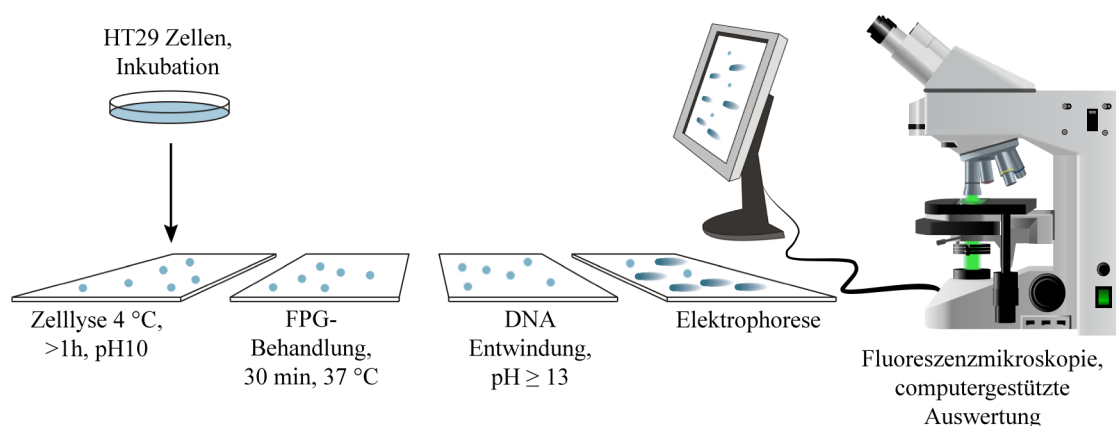


Abbildung 5.17: Versuchsdurchführung des Comet Assays unter alkalischen pH-Bedingungen mit zusätzlicher FPG-Behandlung.

Die zu untersuchenden Zellen werden nach der Substanzinkubation in Agarose auf Objektträgern eingebettet und lysiert. Während im Comet Assay unter neutralen pH-Bedingungen im Anschluss die Elektrophorese bei $\text{pH} = 7,5$ folgt, wird bei der Durchführung unter alkalischen pH-Bedingungen die freigesetzte DNA mit dem DNA-Reparaturenzym FPG behandelt, zur Auftrennung des Doppelstrangs einem alkalischen Milieu ausgesetzt ($\text{pH} \geq 13$) und nachfolgend bei selbigen pH-Bedingungen einer Elektrophorese unterzogen. Bei Schädigung bildet die einge-

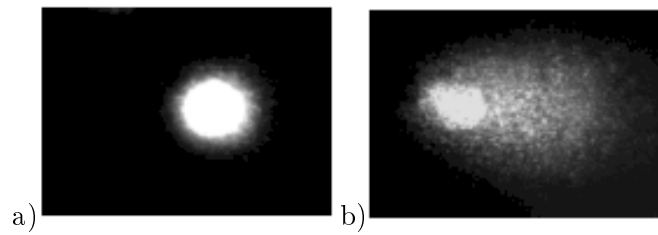


Abbildung 5.18: Aufnahmen angefärbter DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop. a) unbeschädigt, b) beschädigt.

bettete DNA, bedingt durch die schnellere Migration kleinerer DNA-Fragmente in Richtung der Anode im Vergleich zu intakter, hochmolekularer DNA, Kometen-ähnliche Strukturen aus. Diese bestehen aus einem sog. Kometenkopf und einem Kometenschweif und können nach Anfärben der DNA mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht und mittels entsprechender Computersoftware ausgewertet werden. Abbildung 5.18 zeigt beispielhaft den Unterschied zwischen unbeschädigter und beschädigter DNA. Als Maß der DNA-Schädigung dient das Verhältnis der Fluoreszenzintensität des Kometenschweifes zur Fluoreszenzintensität des Kometenkopfes, angegeben als Schweifintensität [%].

5.12.1.1 Reagenzien

Einzelzellgelelektrophorese unter neutralen Bedingungen

PBS:	siehe Abschnitt 5.6.2.1		
Trypsin:	siehe Abschnitt 5.6.2.1		
DMEM:	10 % FKS, 1 % P/S		
Phosphatpuffer für Agarose:	NaCl	137 mM	(8 g/l)
	KCl	2,7 mM	(0,2 g/l)
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM	(0,2 g/l)
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	(1,15 g/l)
NMA:	0,8 % (w/v) in Phos- phatpuffer		

LMA:	0,8 % (w/v) in Phosphatpuffer		
Lysepuffer-Stammlösung:	NaCl	2,5 M	(146,1 g/l)
	EDTA	100 mM	(37,23 g/l)
	TRIS	10 mM	(1,21 g/l)
	Na-Lauroylsarcosinat	1 % (w/v)	
	Substanzen in H ₂ O _{bidest} lösen, auf pH 7,5 einstellen.		
Lysepuffer-Gebrauchslösung:	Lysepuffer-Stammlösung	89 % (v/v)	
	DMSO	10 % (v/v)	
	Triton X-100	1 % (v/v)	
Elektrophoresepuffer:	TRIS	90 mM	(10,90 g/l)
	Borsäure	90 mM	(5,56 g/l)
	EDTA	2 mM	(1,49 g/l)
	Substanzen in H ₂ O _{bidest} lösen, mit HCl auf pH 7,5 einstellen.		
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml in H ₂ O _{bidest}		
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung:	Ethidiumbromid-Stammlösung mit H ₂ O _{bidest} auf eine Endkonzentration von 20 µg/ml verdünnen (1:500).		

Einzelzellgelelektrophorese unter alkalischen Bedingungen mit FPG-Behandlung

Zusätzlich zur Einzelzellgelelektrophorese unter neutralen Bedingungen benötigte Reagenzien:

Lysepuffer-Stammlösung:	NaCl	2,5 M	(146,1 g/l)
	EDTA	100 mM	(37,23 g/l)
	TRIS	100 mM	(12,11 g/l)
	Na-Laurylsarcosinat	1 % (w/v)	
	Substanzen in H ₂ O lösen, mit NaOH auf pH 10 einstellen.		

Lysepuffer-Gebrauchslösung:	Lysepuffer-Stammlösung	89 % (v/v)	
	DMSO	10 % (v/v)	
	Triton X-100	1 % (v/v)	
10 x FPG-Puffer:	HEPES	400 mM	(95,32 g/l)
	KCl	1 M	(74,55 g/l)
	EDTA	5 mM	(1,86 g/l)
	BSA		(2 g/l)
Substanzen in H ₂ O lösen, mit verdünnter KOH pH 8 einstellen. Zu 50 ml aliquotieren und bei –20 °C lagern. Vor Gebrauch auftauen und mit 500 ml H ₂ O 1:10 verdünnen (1 x Enzympuffer).			
FPG-Lösung	1 : 3000 in 1 x FPG-Puffer		
Elektrophoresepuffer:	60 ml NaOH	10 M	(400 g/l)
	10 ml EDTA	200 mM	(74,46 g/l)
	Mit H ₂ O auf 2 l auffüllen.		
Neutralisationspuffer:	TRIS	400 mM	(48,46 g/l)
	In H ₂ O lösen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen.		

5.12.1.2 Durchführung

- Abhängig von der anschließenden Inkubationsdauer zwischen $0,2 \times 10^6$ (24 h) und $0,3 \times 10^6$ (3 h) Zellen pro Gewebekulturschale (Ø 5 cm) ausstreuen und 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 5 ml Zellkulturmedium pro Gewebekulturschale.
- Substanzinkubation mit 5 ml (SWCNT, Pt) der in den Abschnitten 5.7.1 und 5.7.2 aufgeführten Konzentrationen durchführen. Eine 20 µM Menadion-Lösung bzw. 2-minütige UV-Behandlung (UV-B) dienen als Positivkontrollen.

Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Abschnitte bzw. Angaben sind bei der Einzelzellgelelektrophorese unter alkalischen Bedingungen mit FPG-Behandlung alternativ durchzuführen.

Präparation der Objektträger (OT)

Bei der Einzelzellgelelektrophorese unter neutralen Bedingungen wird für jede inkubierte Petrischale ein OT mit Agarose beschichtet. Für den Comet Assay unter alkalischen Elektrophoresebedingungen mit FPG-Behandlung ist je ein zusätzlicher OT vorzubereiten. Es werden einseitig mattierte OT verwendet.

- Auf die mattierte Seite des OT 40 µl NMA aufbringen und mit einem zweiten OT glatt streichen. OT aushärten lassen.
- Je OT zweimal 65 µl NMA im Abstand von ca. 1 cm aufpipettieren und jeweils ein Deckglas (24 x 24 mm) luftblasenfrei auflegen.
- OT auf einer eisgekühlten Unterlage mind. 15 min aushärten lassen. Bis zum Gebrauch in einer feuchten Kammer bei 4 °C aufbewahren.

Zellaufarbeitung

- Nach Ablauf der Inkubationszeit Medium abgießen und 2 x mit jeweils 2 ml auf 37 °C temperiertem PBS waschen.
- 0,5 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen auf der Gewebekulturschale verteilen und 1,5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren.
- Trypsinreaktion durch Zugabe von 0,5 ml Zellkulturmedium (10 % FKS, 1 % P/S) abstoppen.
- Nach mehrmaligem Abspülen des Plattenbodens die Zellsuspension in ein eisgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführen. Plattenboden mit 0,5 ml Zellkulturmedium (10 % FKS, 1 % P/S) nachspülen und mit der vorherigen Fraktion vereinigen.

Viabilitätsbestimmung

- Die Bestimmung der Viabilität erfolgt nach Anfärben eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblau (Verd. 1:2 od. 1:5), wie in Abschnitt 5.10.1 beschrieben.
- Die Viabilität sollte $\geq 80\%$ betragen.

Die Viabilitätsbestimmung dient dem Ausschluss zytotoxischer Effekte.

Einbettung der Zellen auf dem OT

- Von den Zellsuspensionen je zwei (*vier) Aliquote à 30.000 Zellen entnehmen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen, zentrifugieren (4 °C, 420 x g, 10 min) und anschließend den Überstand vorsichtig abpipettieren.
- Die vorbereiteten OT kodieren (Blindversuch) und die Deckgläser seitlich abziehen.
- Die Zellen in 65 µl LMA resuspendieren, auf die NMA-Gelpads auftragen und mit Deckgläsern luftblasenfrei abdecken.
- Zum Aushärten der LMA OT ca. 30 min auf eisgekühlter Unterlage liegen lassen.

Zelllyse

- 100 ml Lysepuffer-Gebrauchslösung in einer Coplin-Kammer für mind. 1 h bei 4 °C vor-kühlen.
- Deckgläser seitlich von den OT abziehen.
- OT in die mit Lysepuffer gefüllte Coplin-Kammer stellen und zur Zelllyse über Nacht bei 4 °C aufbewahren.

***FPG-Behandlung**

- OT aus dem Lysepuffer nehmen, kurz abtropfen lassen und 3 x für 5 min bei 4 °C mit vor-gekühltem FPG-Enzympuffer waschen. Während des letzten Waschschrilles 10 µl-Aliquote des konzentrierten Enzyms auf Eis auftauen lassen.
- Enzym-Aliquot mit 290 µl 4 °C kaltem 1 x FPG-Puffer verdünnen (1:30).
- Auf jedes Gelpad der für die FPG-Behandlung vorgesehenen OT jeweils 50 µl verdünnte FPG-Lösung pipettieren; die Gelpads der übrigen OT (ohne FPG-Behandlung) stattdessen mit 50 µl FPG-Puffer bedecken.
- Deckgläser auflegen und in einer Feuchtekammer 30 min bei 37 °C inkubieren.

***Alkalisierung und Elektrophorese**

- Deckgläser entfernen und OT in die eisgekühlte Elektrophoresekammer legen. Elektrophoresepuffer einfüllen und OT darin abgedunkelt 20 min alkalisieren.
- Die 20-minütige Elektrophorese erfolgt ebenfalls abgedunkelt bei 25 V und 300 mA. Die erforderliche Stromstärke wird durch Hinzufügen oder Entfernen von Elektrophoresepuffer eingestellt.

Elektrophorese

- OT aus dem Lysepuffer herausnehmen, kurz abtropfen lassen und in die eisgekühlte Elektrophoresekammer legen. Elektrophoresepuffer einfüllen und OT darin 20 min äquilibrieren.
- Die 20-minütige Elektrophorese erfolgt bei 25 V und maximaler Stromstärke (ca. 44 mA bei Verwendung von 2 l Elektrophoresepuffer).

Neutralisation

- Zur Neutralisation werden die OT 3 x für 5 min bei 4 °C mit Neutralisationspuffer gewaschen.

Anfärben der DNA

- Auf jedes Gelpad werden 30 µl Ethidiumbromid-Gebrauchslösung pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt.

Auswertung

Die Auswertung der Objektträger sollte möglichst zeitnah nach der Anfärbung erfolgen, da Migration des Ethidiumbromids aus der DNA in das umliegende Agarosegel zu Unschärfen führt. Die OT 2 - 3 Tage in einer feuchten Kammer bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop mit einer Quecksilberdampf Lampe als Lichtquelle. Ein nachgeschalteter CY-3-Filter führt zur Anregung des Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 512 nm; die Emission liegt bei einer Wellenlänge von 590 nm. Das Bild wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen, an einen PC weitergeleitet und mit der Software Comet Assay IV-System von Perceptive Instruments ausgewertet, indem die Schweifintensität berechnet wird. Die Schweifintensität stellt sich als prozentualer DNA-Gehalt dar und korreliert linear mit der DNA-Schädigung [Collins et al., 2008]. Pro Gelpad werden mind. 50 einzelne, sich nicht überlagernde Zellen ausgewertet und der Mittelwert der Schweifintensitäten gebildet. Hierbei werden Außenränder und Flächen um Luftblasen von der Auswertung ausgenommen, da diese Stellen häufig keine Substanz-vermittelten sondern experimentell bedingte DNA-Schäden aufzeigen. Nach der Auswertung aller OT eines Experimentes erfolgt die Decodierung.

5.12.2 Untersuchung zur Modulation der p53-Phosphorylierung mittels disk. SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Die Untersuchungen zur Modulation der p53-Phosphorylierung durch die in dieser Arbeit untersuchten SWCNTs erfolgten unter Verwendung der in Abschnitt 5.11.3 bereits beschriebenen disk. SDS-Page und Western Blot Analyse. Abweichungen zu den im genannten Abschnitt dargestellten Durchführungsprotokoll sind nachfolgend ergänzend aufgeführt.

5.12.2.1 Reagenzien

RIPA-Puffer:	TRIS/HCl	50 mM	(6,06 g/l)
	NaCl	250 mM	(14,6 g/l)
	EDTA	1 mM	(0,372 g/l)
	NaF	1 mM	(0,042 g/l)
	Igepal CA-630	1 % (v/v)	10 ml
In H ₂ O _{bidest} lösen und pH 7,4 einstellen. (100 ml ansetzen)			

Direkt vor Gebrauch zugeben:

	Natrium-Orthovanadat	1 % (v/v)
	Proteaseinhibitor-Mix	2 % (v/v)
	PMSF	0,5 % (v/v)
Primärantikörper	p-p53(Ser 15)-Antikörper (rabbit, Santa Cruz), 1:200 in Blockingpuffer verdünnen. α -Tubulin-Antikörper (mouse, Santa Cruz), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen.	
Sekundärantikörper	Goat anti-rabbit IgG-HRP-Antikörper (New England Biolabs), 1:2000 in Blockingpuffer verdünnen.	

5.12.2.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Abhängig von der anschließenden Inkubationsdauer zwischen $1,2 \times 10^6$ (24 h) und $1,6 \times 10^6$ (3 h) Zellen pro Gewebekulturschale ($\varnothing$ 10 cm) ausstreuen und 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 10 ml Zellkulturmedium pro Gewebekulturschale. Zur Versuchsdurchführung sollten die Zellen eine Konfluenz von 70 bis 80 % aufweisen.
- Substanzinkubation mit 13,55 ml (SWCNT) der in Abschnitt 5.7.1 aufgeführten Konzentrationen für 3 und 24 h durchführen. Hydroxyurea (HU, 1,5 mM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Als optimale Expositionszeit für eine reproduzierbare p-p53 Akkumulation in HT29-Zellen durch HU wurde in Vorversuchen eine Inkubationszeit von 3 h ermittelt. Daher wurden die Zellen im Falle der 24-stündigen SWCNT-Behandlung 3 h vor Inkubationsende mit der Positivkontrolle behandelt.

Gewinnung der Zellproteine Die folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

- Medium entfernen und Zellen 2 x mit je 3 ml eiskaltem PBS waschen. Beim zweiten Waschschritt PBS-Rückstände sorgfältig abpipettieren.
- Je Gewebekulturschale 200 μ l RIPA-Puffer aufgeben und Zellen mithilfe eines Zellschabers ablösen und in einen vorgekühlten Handhomogenisator überführen.
- Zelllysat mit je 40 Hüben mit dem „tight“-Pistill homogenisieren und das Zellhomogenisat in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführen.
- Zellhomogenisat anschließend 10 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugieren und Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführen .

- Proben mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ 1:10 verdünnen und Protein-Bestimmung nach Bradford durchführen (siehe Abschnitt 5.9.1).
- Proteingehalt jeder Probe auf 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einstellen und mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzen.
- Proben 5 min bei 950 rpm und 95 °C im „Thermocycler“ denaturieren.

Auftrennung der Proteine mittels disk. SDS-PAGE Zur Proteintrennung werden entsprechend dem Molekulargewicht (MG) der in diesem Abschnitt untersuchten Proteine Trenngele mit gleichem Polyacrylamidanteil (AA) verwendet (siehe Tab. 5.8).

Tabelle 5.8: Molekulargewichte der zu charakterisierenden Proteine sowie der jeweils benötigte Polyacrylamidanteil der verwendeten Trenngele.

Zu charakterisierendes Protein	MG [kDa]	Polyacrylamidanteil im Trenngel [%]
p-p53	53	12
α -Tubulin	54	12

Das Pipettierschema für ein Trenngel mit einem Polyacrylamidgelanteil von 12 % sowie das Pipettierschema für das 4 %-ige Sammelgel sind Abschnitt 5.11.3 zu entnehmen.

5.12.3 Untersuchung zur Induktion von Mikrokernen mittels Mikrokern-Test

Mikrokerne sind von einer Kernhülle umgebene chromatinhaltige Partikel, die zusätzlich zum Hauptkern in der Zelle vorkommen können und sich durch ihre geringere Größe von diesem unterscheiden. Mikrokerne enthalten Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die nach der Zellteilung nicht in einen der Tochterkerne integriert wurden und somit als Geninformation für die Tochterzellen verloren gehen (siehe Abschnitt 2.7.3). Die Induktion von Mikrokernen nach Substanzbehandlung stellt ein genotoxisches Potential der zu untersuchenden Substanz dar.

Zusätzlich zur Bestimmung der Mikrokernanzahl, erlaubt der MN („micronuclei“-Test eine Unterscheidung zwischen einer aneugen (Verlust ganzer Chromosomen) und klastogenen (Verlust von Chromosomenfragmenten) Wirkung der Testsubstanz. Hierzu wird eine immunologische Fluoreszenzmarkierung von Kinetochorproteinen durchgeführt. Als Primärantikörper werden Anti-Kinetochor-Antikörper verwendet, welche mithilfe von fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht werden. Beim Vorhandensein der Kinetochorregion im Mikrokern kann dann von der Erfassung eines ganzen Chromosoms ausgegangen werden. Allerdings bleibt anzumerken, dass diese Annahme eine Vereinfachung darstellt, da auch Chromosomenbruchstücke zufällig die Kinetochorregion beinhalten können.

5.12.3.1 Reagenzien

2 x CB-Puffer:	NaCl	137 mM	(8,01 g/l)
	KCl	5 mM	(0,37 g/l)
	Na ₂ HPO ₄	1,1 mM	(0,16 g/l)
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM	(0,09 g/l)
	MgCl ₂	2 mM	(0,19 g/l)
	EDTA	2 mM	(0,74 g/l)
	PIPES	5 mM	(1,51 g/l)
	Glukose	5,5 mM	(0,99 g/l)
In H ₂ O _{bidest} lösen und pH 6,1 einstellen.			
Triton X-100-Lösung:	10 % (v/v) in H ₂ O _{bidest}		
Formaldehyd-Fixans:	3,5 g Paraformaldehyd in 50 ml H ₂ O _{bidest} suspendieren und mit 1 ml NaOH (1 M) versetzen. Für 5 min auf 60 °C erhitzen. Davon 40 ml mit dem gleichen Volumen 2 x CB-Puffer mischen und den pH-Wert auf 6,1 einstellen. 2 ml Triton X-100-Lösung zumischen. Die Lösung ist im Kühlschrank etwa 4 h haltbar.		
10 x PBS-CMF:	NaCl	1,37 M	(80 g/l)
	KCl	27 mM	(2 g/l)
	Na ₂ HPO ₄	78 mM	(11,1 g/l)
	KH ₂ PO ₄	15 mM	(2 g/l)
In H ₂ O _{bidest} lösen und auf 1 l auffüllen.			
1 x PBS-CMF:	Ein Volumenteil 10 x PBS-CMF in etwa 5 Volumenteilen H ₂ O _{bidest} aufnehmen, pH-Wert auf 8,0 einstellen und mit H ₂ O _{bidest} auf 10 Volumenteile auffüllen.		
Blockingreagenz:	Ziegennullserum		
BSA-Lösung:	1 % (w/v) in PBS-CMF		

Primäre Antikörper-Lösungen:	Centromer positive Control ("CREST-Antikörper") (1:100 Verdünnung) (DPC Biermann, Bad Nauheim). Monoklonaler Anti- α -Tubulin-Antikörper aus Maus-Ascitesflüssigkeit (1:500 Verdünnung) (Sigma, Taufkirchen). Lösungen jeweils in BSA-Lösung ansetzen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 10 Volumenteile auffüllen.		
Sekundäre Antikörper-Lösungen:	Polyvalenter Anti-Human-Antikörper der Ziege (Sigma, Taufkirchen); FITC-konjugiert (1:200 Verdünnung). Anti-Maus-Antikörper der Ziege (Jackson Immuno Research, UK); CY3-konjugiert (1:125 Verdünnung). Lösungen jeweils in BSA-Lösung ansetzen.		
PBS-Lösung:	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,65 mM	(0,1 g/l)
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,68 mM	(0,13 g/l)
	In 1 l PBS-CMF lösen.		
Antifade-Lösung:	100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid in 10 ml PBS-Lösung lösen und mit NaHCO_3 -Lösung (0,5 M, pH 9,0 mit NaOH) auf pH 8,0 einstellen. Mit Glycerin auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren und bei -20°C lichtgeschützt aufbewahren.		
DAPI-Antifade-Lösung:	In 10 ml Antifade-Lösung werden 10 μl DAPI-Lösung (1 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) gelöst (Konz.: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 0,7 ml Aliquots lichtgeschützt bei -20°C aufbewahren.		

5.12.3.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit den Testsubstanzen

- $0,1 \times 10^6$ V79-Zellen je Vertiefung auf OT in Quadriperm-Schalen ausstreuen und 24 h bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von V79-Zellen erfolgt in 5 ml Zellkulturmedium je OT.
- Substanzinkubation mit 5,75 ml (SWCNT) der in Abschnitt 5.7.1 aufgeführten Konzentrationen für 24 h durchführen. NQO (0,3 μM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Fixierung und Färbung der Zellen

- OT für 5 min in das Formaldehyd-Fixans stellen und anschließend bis zur Verwendung mind. 30 min in Methanol (-20°C) lagern.

Alle Inkubationsschritte erfolgen in einer feuchten Kammer bei 37 °C. Zum Inkubieren werden die OT stets mit Deckgläsern bedeckt.

- OT 3 x 5 min in PBS-CMF waschen.
- OT 1 h mit je 200 µl Ziegennullserum inkubieren und anschließend Deckgläser entfernen und OT in PBS-CMF schwenken.
- Mit 100 µl Primärantikörper-Lösung je OT für 1 h inkubieren. Im Anschluss OT nach Entfernen der Deckgläser 3 x 5 min in PBS-CMF waschen.
- OT für 1,5 h mit je 100 µl Sekundärantikörper-Lösung behandeln und danach wiederum 3 x 5 min in PBS-CMF waschen.
- Im Folgenden OT mit jeweils 30 µl DAPI-Antifade-Lösung behandeln. Die OT sind im Dunkeln mehrere Wochen haltbar.

Auswertung Die Auswertung erfolgt optisch unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es werden mind. 2.000 Zellen ausgewertet. Die Anzahl der Zellen und der kinetochor-positiven und -negativen Mikrokerne wird bestimmt und der Mittelwert zwischen den ausgewerteten Objektträgern berechnet. Beim Auswerten wurden die in Abschnitt 2.7.3 aufgeführten Anforderungen an Mikrokerne berücksichtigt [Miller et al., 1998; Kirsch-Volders et al., 2000].

5.12.4 Bestimmung der DNA-Platinierung

Um die Beeinflussung der DNA-Integrität durch Pt-NP weiter beurteilen zu können, wurde exemplarisch anhand der Pt-Präparation mit Pt-Partikeln des Durchmessers < 20 nm untersucht, ob Pt nach Inkubation von HT29-Zellen zur DNA gelangt und damit die Möglichkeit einer direkten Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten besteht. Hierzu wurde im Anschluss an die Partikelinkubation die DNA der Zellen mithilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Nachfolgend wurde der DNA-Gehalt der Proben fotometrisch bestimmt, die Proben verascht und die jeweiligen Pt-Gehalte mittels ICP-MS bestimmt. Die ICP-MS-Bestimmungen wurden von Dr. Ch. Hartinger (Institut für Anorganische Chemie, Universität Wien) durchgeführt.

5.12.4.1 Reagenzien

PBS:	siehe Abschnitt 5.6.2.1
Trypsin:	siehe Abschnitt 5.6.2.1
DMEM:	10 % FKS, 1 % P/S
DNeasy® Blood & Tissue Kit :	Qiagen
Ethanol:	96 - 100 % (v/v)
Salpetersäure (HNO ₃):	65 % (v/v), p.a.

Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂):	30 % (v/v), suprapurum
--	------------------------

Salzsäure (HCl)

Der DNeasy[®]Blood & Tissue Kit von Qiagen enthält alle benötigten Puffer (AW1-, AW2-, AL-, AE-Puffer) Proteinase K sowie Extraktionssäulen und Reaktionsgefäße.

5.12.4.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit der Testsubstanz

- Abhängig von der anschließenden Inkubationsdauer zwischen $3,5 \times 10^6$ (1 und 4 h) und $3,0 \times 10^6$ (24 h) Zellen pro Gewebekulturschale (Ø 15 cm) ausstreuen und 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 20 ml Zellkulturmedium pro Gewebekulturschale. Zur Versuchsdurchführung sollten die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % aufweisen.
- Substanzinkubation mit 20 ml (Pt < 20 nm) der in (siehe Abschnitt 5.7.2) aufgeführten Konzentrationen für 1, 4 und 24 h durchführen. Cisplatin (Cis-Pt, 10 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Zellaufarbeitung

- Medium entfernen und Zellen 3 x mit je 5 ml eiskaltem PBS waschen. Beim dritten Waschschritt PBS-Rückstände sorgfältig abpipettieren.
- 2,5 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen auf der Gewebekulturschale verteilen und 2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren.
- Trypsinreaktion durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium (10 % FKS, 1 % P/S) abstoppen.
- Nach mehrmaligem Abspülen des Plattenbodens die Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführen.
- Viabilitätsbestimmung nach Anfärben eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblau, wie in Abschnitt 5.6.2.6 beschrieben, durchführen. Die Viabilität sollte nicht weniger als 80 % betragen.
- Ein Aliquot von 5×10^6 Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und 10 min bei $420 \times g$ und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Zellen 2 x mit jeweils 200 µl eiskaltem PBS waschen. Das resultierende Zellpellet für die anschließende DNA-Isolierung in 200 µl PBS resuspendieren.

DNA-Isolierung und Bestimmung des DNA-Gehalts Die DNA-Isolierung erfolgt mithilfe des DNeasy[®]Blood & Tissue Kit (Qiagen) nach dem Protokoll: „Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells“. Im ersten Arbeitsschritt erfolgt die Zelllyse mithilfe des Enzyms

Proteinase K. Im Anschluss erfolgt die Bindung der Gesamt-DNA an die DNeasy-Membran. Nach dem Auswaschen von Verunreinigungen mit Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen, wird die DNA von der DNeasy Mini Spin-Säule eluiert (siehe Abb. 5.19).

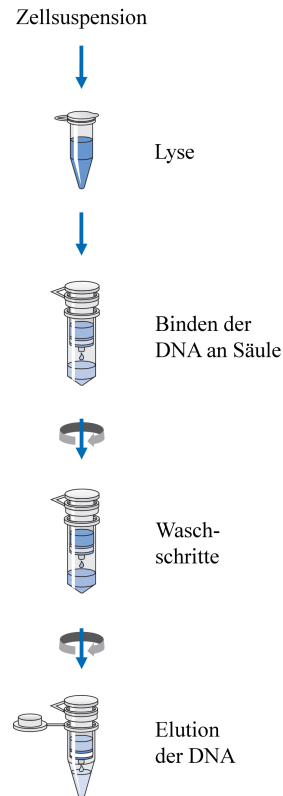


Abbildung 5.19: Schematische Darstellung der DNA-Isolierung mithilfe des DNeasy®Blood & Tissue Kit [modifiziert nach Qiagen Handbuch].

- Zellsuspension mit zur Zellyse mit 20 µl Proteinase K versetzen.
- 200 µl AL-Puffer (Ethanol-frei) zugeben, gründlich mischen und 10 min bei 56 °C inkubieren.
- 200 µl Ethanol zusetzen (96 - 100 %), gründlich mischen und Zellsuspension auf die in ein 2 ml Reaktionsgefäß platzierte DNeasy Säule aufgeben.
- 1 min bei 6.000 x *g* zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen, Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß platzieren, 500 µl AW1-Puffer aufgeben und erneut 1 min bei 6.000 x *g* zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen, Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß platzieren, 500 µl AW2-Puffer aufgeben und 3 min bei 20.000 x *g* zentrifugieren.
- Durchfluss wiederum verwerfen, Säule in ein 2 ml Eppendorfgefäß platzieren, 200 µl AE-Puffer aufgeben und 1 min bei RT inkubieren.
- Zur DNA-Elution 1 min bei 6.000 x *g* zentrifugieren.
- Elutionsschritt erneut durchführen, so dass am Ende der Aufarbeitung 400 µl Eluat erhalten werden.
- Im Anschluss DNA-Gehalt der Proben bestimmen. Die Gehaltsbestimmung der isolierten

Gesamt-DNA erfolgt in einer Dreifachbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm mithilfe des Nanodrop[®]-Spektralfotometers. Die Reinheit der gewonnenen DNA wird durch das Verhältnis zwischen der Absorption bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 260$ nm (A_{280}/A_{260}) sowie $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 230$ nm (A_{260}/A_{230}) bewertet. Eine ausreichende Reinheit ist bei einem A_{280}/A_{260} -Verhältnis von 2,0 bzw. bei einem A_{260}/A_{230} -Verhältnis von 1,8 gegeben (DNEasy[®]Blood & Tissue Handbuch).

Veraschung der Proben

- 350 μ l des DNA-Eluats in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen und bei 80 °C (Heizblock) bis zur vollständigen Trockenheit verdampfen.
- Im Anschluss Proben durch Zugabe von 100 μ l $\text{HNO}_{3\text{konz.}}$ und 100 μ l H_2O_2 aufschließen. Hierzu die Proben nach Zugabe der Lösungen mit geschlossenem Deckel 1 h bei RT stehen lassen.
- Nachfolgend Proben über Nacht bei 80 °C (Heizblock) veraschen.
- Veraschrückstand in 3 ml HCl aufnehmen und zur Metall-Bestimmung mittels ICP-MS einsetzen.

Auswertung Der mittels ICP-MS ermittelte Pt-Gehalt der Proben wird auf den jeweiligen DNA-Gehalt normiert und als fmol Pt pro 1 μ g DNA berechnet.

5.13 Bestimmung fragmentierter DNA mittels Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Im Verlauf der apoptotischen Signalkaskade aktiviert Caspase-3 die Endonuklease CAD (caspase activated DNase). Endonukleasen spalten die DNA zwischen den Nukleosomen, wodurch Fragmente von ca. 180 kDa entstehen. Diese Fragmente, bestehend aus DNA und Histonen, werden mit einem Sandwich-ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) durch Einsatz monoklonaler Antikörper gegen DNA-Fragmente und Histone nachgewiesen (siehe Abb. 5.20). Der Anti-Histon-Antikörper ist zur Bindung an die mit Streptavidin beschichtete Lochplatte mit Biotin gekoppelt. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgt über die fotometrische Messung einer Peroxidase-vermittelten Farbreaktion. Hierzu ist die Peroxidase an den Anti-DNA-Antikörper gekoppelt; das Substrat ist 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure, ABTS[®]).

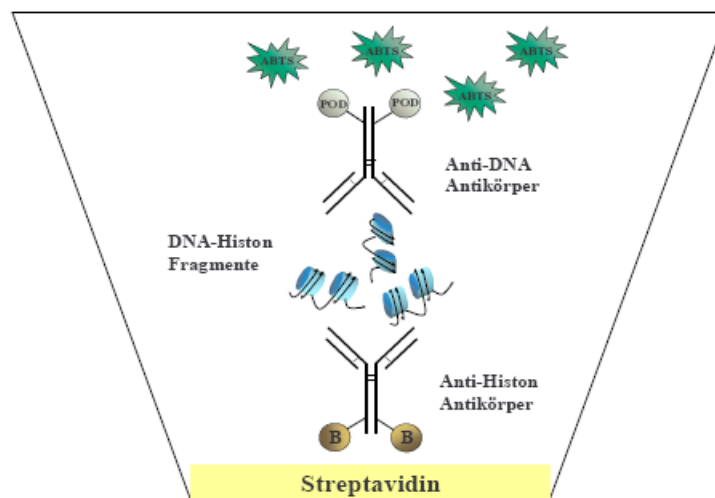


Abbildung 5.20: Prinzip des Cell Death Detection ELISA^{Plus} von Roche. ABTS[®], 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure); POD, Peroxidase; B, Biotin.

5.13.1 Reagenzien

PBS:	siehe Abschnitt 5.6.2.1
Trypsin:	siehe Abschnitt 5.6.2.1
DMEM:	10 % FKS, 1 % P/S
Cell Death Detection ELISA ^{Plus} Kit:	Roche Applied Science, Mannheim

Das ELISA-Testsystem von Roche enthält alle benötigten Antikörper, die Positivkontrolle (Histone), Inkubationspuffer, Lysepuffer, Substratpuffer, ABTS[®] und eine Streptavidin-beschichtete 96-Lochplatte.

- Vor erstmaligem Gebrauch des Kits die Lyophilisate des primären Anti-Histon-Biotin-Antikörpers, des sekundären Peroxidase (POD)-gekoppelten Anti-DNA-Antikörpers und des DNA-Histon-Komplexes (Positivkontrolle) in je 450 µl H₂O_{bidest} lösen, 10 min bei RT stehen lassen und danach gut mischen (Vortex). Die Lösungen sind anschließend bei Lagerung bei 2 - 8 °C zwei Monate stabil.
- Direkt vor der Versuchsdurchführung eine ABTS[®]-Tablette in 5 ml Substratpuffer lösen und bei 15 - 25 °C lagern. Lösung vor Licht schützen!
- Das Immureagenz ebenfalls erst kurz vor Gebrauch herstellen. Hierzu 1/20 (v/v) Anti-DNA Antikörper, 1/20 (v/v) Anti-Histon-Biotin Antikörper und 18/20 (v/v) Inkubationspuffer mischen.

Der Anti-Histon-Biotin Antikörper bindet spezifisch Histon H1, H2A, H2B, H3 und H4, der Anti-DNA Antikörper an einzel- und doppelsträngige DNA.

5.13.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit den Testsubstanzen

- 1×10^6 Zellen pro Petrischale ($\varnothing$ 10 cm) ausstreuen und 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Die Kultivierung von HT29-Zellen erfolgt in 10 ml Zellkulturmedium pro Petrischale.
- Substanzinkubation mit 13,55 ml der in Abschnitt 5.7.1 aufgeführten Konzentrationen für 24 h durchführen.

Zellaufarbeitung

- Nach Ablauf der Inkubationszeit Medium in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführen und Petrischale 1 x mit 1 ml PBS waschen. Die Waschlösung ebenfalls in das 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführen.
- 1 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen auf der Petrischale verteilen und 2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren.
- Trypsinreaktion durch Zugabe von 1 ml eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums abstoppen.
- Nach mehrmaligem Abspülen des Plattenbodens die Zellsuspension in das jeweilige 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführen. Plattenboden 2 x mit je 1 ml eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums nachspülen und mit der vorherigen Fraktion vereinen.
- Zellsuspension bei 300 x *g* und RT für 5 min zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, Zellpellet in 2 ml PBS resuspendieren und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführen.
- Je Platte Zellzahl nach Abschnitt 5.6.2.6 bestimmen.
- Ein Aliquot von 15.000 Zellen entnehmen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen.
- 200 µl Lyse-Puffer zugeben. Zur Zelllyse Proben 30 min bei RT stehen lassen, zwischendurch vortexen.
- Zellsuspension bei 20.000 x *g* und RT für 10 min zentrifugieren.

Messung Alle Ansätze werden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

- Je 20 µl des Zelllysats (Überstand), des Inkubationspuffers (Hintergrund) und der Positivkontrolle in die Streptavidin-beschichtete Lochplatte pipettieren. Es ist darauf zu achten, dass bei Überführung des Zentrifugationsüberstands, dass Zellpellet nicht beschädigt wird.
- Je Loch 80 µl Immunoreagenz hinzupipettieren.
- Platte abgedeckt 30 min bei RT und 300 rpm auf dem Vortexer schütteln.
- Lösung in jedem Loch mit einer Kanüle absaugen und 3 x mit je 100 µl Inkubationspuffer waschen.
- Je Loch 100 µl ABTS[®]-Lösung zugeben.
- Platte im Mikrotiterplattenlesegerät bei 405 nm gegen ABTS[®]-Lösung als Leerwert ($\lambda_{\text{Ref}} = 490 \text{ nm}$) messen.

- Die Messung alle 2 Minuten durchführen, bis der Absorptionswert der Positivkontrolle zwischen 0,7 und 1 liegt (linearer Bereich).

Auswertung Die DNA-Fragmentierung wird in Bezug auf die Kontrolle (NaC; 0,02 %) als T/C [%] berechnet.

5.14 Untersuchung zum intestinalen Transport von Platin mit dem Caco-2 Millicell®-System

Als Modell für die intestinale Barriere wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 gewählt. Diese Zelllinie hat die Besonderheit innerhalb von 21 Tagen auszdifferenzieren und dabei dem Darmepithel ähnliche Eigenschaften auszubilden [Levy et al., 1995]. Die Ausdifferenzierung erfolgt bevorzugt auf mikroporösen Membranen unterschiedlicher Materialien. Für die Untersuchungen zum intestinalen Transport von Pt wurde das Millicell®-System der Firma Millipore GmbH verwendet. Die „Inserts“ des 24-Loch Systems bestehen aus eingehängten Einsätzen, welche mit Polyethylenterephthalat (PET)-Membranen eines Porendurchmessers von 0,4 µm versehen sind. Durch den Membran-Einsatz wird jedes der 24 Löcher in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment geteilt (siehe Abb. 5.21).

Die Caco-2 Zellen werden auf den PET-Membranen ausgesät. Nach Ausbildung eines intakten Caco-2 Monolayers und Ausdifferenzierung der Zellen erfolgt die Partikelexposition. Im Anschluss wird der Platingehalt im apikalen und basolateralen Kompartiment nach Mediumabnahme und Veraschung (siehe Abschnitt 5.12.4.2) mittels ICP-MS bestimmt. Zusätzlich wird die Intaktheit des Zellrasens mithilfe des Markermoleküls Lucifer Yellow (LY) überprüft. Hierzu wird der Zellmonolayer mit LY apikal inkubiert und gemessen, welche Farbstoffmenge basolateral nach 1 h detektiert werden kann. Die Bestimmung der Platingehalte mittels ICP-MS wurde von Dr. Ch. Hartinger am Institut für Anorganische Chemie der Universität Wien durchgeführt.

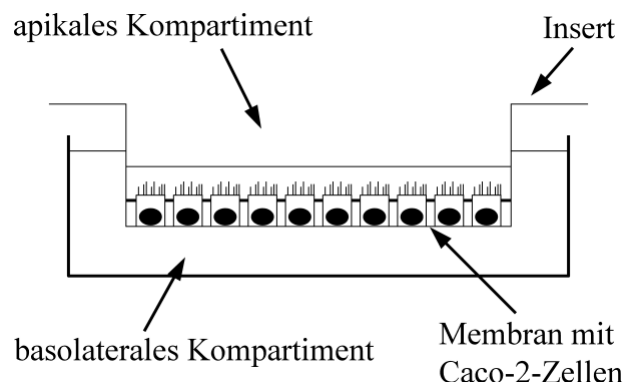


Abbildung 5.21: Schematische Darstellung eines „Transwells“, welches durch ein „Insert“ in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment geteilt wird. Das „Insert“ ist mit einer Membran versehen, auf welcher ein Caco-2 Monolayer ausgebildet ist.

5.14.1 Reagenzien

DMEM/F12:	+ 3,15 g/l Glukose + L(−) Glutamin + 15 mM HEPES + Phenolrot + 1,2 g/l Na ₂ CO ₃		
HBSS:	CaCl ₂	1,2 mM	(0,13 g/l)
	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0,5 mM	(0,10 g/l)
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4 mM	(0,10 g/l)
	KCl	5,3 mM	(0,40 g/l)
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM	(0,05 g/l)
	NaHCO ₃	4,2 mM	(0,35 g/l)
	NaCl	0,14 M	(8,18 g/l)
	Na ₂ HPO ₄	0,3 mM	(0,04 g/l)
	Glukose	5,6 mM	(1,01 g/l)
	In H ₂ O _{bidest} lösen und mit HCl auf pH 7,4 einstellen.		
Lucifer Yellow (LY)-Lösung:	10 mg LY werden in 100 ml HBSS gelöst		

5.14.2 Durchführung

Zellkultivierung und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Um ein besseres Anwachsen der Zellen zu gewährleisten, Membran vor dem Ausstreuen der Caco-2 Zellen für 24 h äquilibrieren. Hierzu das obere Kompartiment mit 0,4 ml und die untere Kammer mit 0,8 ml eines 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums versehen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte belassen.
- Medium absaugen, die untere Kammer abermals mit 0,8 ml des 10 % FKS-haltigen Zellkulturmediums versehen und in das obere Kompartiment 0,06 × 10⁶ Zellen in 0,4 ml Zellkulturmedium pro Loch ausstreuen und 21 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte anwachsen lassen. Der Mediumwechsel sollte alle 2 Tage erfolgen.

- Am 21. Tag Inkubation mit 0,4 ml (Pt) der in Abschnitt 5.7.2 aufgeführten Konzentrationen für 24 h durchführen.
- Im Anschluss an die Partikelinkubation Inkubationsmedium des apikalen (200 µl) und des basolateralen Kompartiments (600 µl) entnehmen und zur Pt-Gehaltsbestimmung mittels ICP-MS einsetzen.

Überprüfung der Intaktheit des Caco-2 Monolayers mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow (LY) Die Überprüfung der Caco-2 Zellschicht auf Intaktheit mithilfe der Transportrate des Dilithiumsalzes LY wurde direkt nach der Partikelexposition durchgeführt (Strukturformel siehe Abb. 5.22).

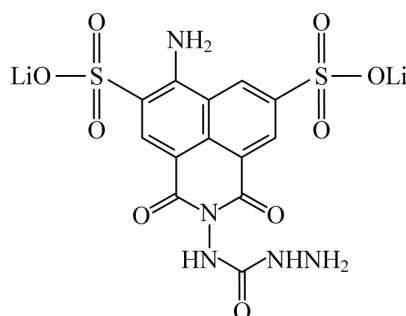


Abbildung 5.22: Struktur von Lucifer Yellow (LY).

- Nach vollständiger Probenentnahme beide Kompartimente 2 x mit je 2 ml HBSS waschen.
- Auf basolateraler Seite 0,8 ml HBSS hinzugeben. Auf apikaler Seite 0,4 ml einer LY-Lösung von 100 µg LY / ml HBSS zugeben und Platte für 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubieren.
- Nach Ende der Inkubationszeit auf basolateraler Seite ein Aliquot entnehmen und den Gehalt an LY als relative Fluoreszenz (relative fluorescence units, RFU) im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm messen.

Auswertung Für die Berechnung des prozentualen Transports von LY wurde ein Blindwert aus reinem HBSS gemessen sowie die Fluoreszenz einer LY-Lösung, deren Konzentration 33,3 µg/ml in HBSS betrug. Dieser sog. Equilibriumwert entspricht einer gleichmäßigen Verteilung von LY im gesamten Loch. Der Wert 33,3 µg/ml lässt sich mit folgender Gleichung bestimmen:

$$RFU(\text{Equilibrium}) = \frac{(LY - \text{Konz. im apikalen Kompartiment } t_0) \times (V_{\text{apikal}})}{V_{\text{apikal}} + V_{\text{basolateral}}}$$

$$RFU(\text{Equilibrium}_{24} - \text{Loch}) = \frac{100 \mu\text{g/ml} \times 0,4 \text{ ml}}{0,4 \text{ ml} + 0,8 \text{ ml}} = 33,3 \mu\text{g/ml}$$

Die LY-Passage im Testwell wird mithilfe folgender Gleichung bestimmt:

$$LY - \text{Passage}\% = \frac{RFU(\text{Probe}) - RFU(\text{Blind})}{RFU(\text{Equilibrium}) - RFU(\text{Blind})} \times 100$$

Liegt der Wert unter 1 %/h, wird der Zellmonolayer als intakt erachtet. Falls der Wert über 1%/h beträgt, kann der Monolayer vor oder während der Inkubation geschädigt worden sein und ist daher nicht intakt. Diese Löcher sollten nicht in die Auswertung der Untersuchungen einbezogen werden.

Literaturverzeichnis

[Abbracchio et al., 1982]

Abbracchio MP, Simmons-Hansen J, Costa M. 1982. Cytoplasmic dissolution of phagocytized crystalline nickel sulfide particles: a prerequisite for nuclear uptake of nickel. *J Toxicol Environ Health* 9 (4): 663–676.

[Abdelmohsen et al., 2003]

Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H, Klotz LO. 2003. Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-4: Role of glutathione and tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 278: 38369–38367.

[Adcock, 1997]

Adcock IM. 1997. Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B. *Monaldi Arch Chest Dis* 52: 178–186.

[Aegerter et al., 2008]

Aegerter M, Almeida R, Soutar A, Tadanaga K, Yang H, Watanabe T. 2008. Coatings made by sol-gel and chemical nanotechnology. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 47(2): 203–236.

[Aktories et al., 2009]

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. 2009. *Pharmakologie und Toxikologie*. Urban und Fischer 2. Auflage.

[Alessandrini et al., 2006]

Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, Jakob T. 2006. Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol* 117: 824–830.

[Amyere et al., 2000]

Amyere M, Payraastre B, Krause U, Van der Smissen P, Veithen A, Courtoy PJ. 2000. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol Biol Cell* 11: 3453–3467.

[Anderson und Jacobson, 2002]

Anderson RG, Jacobson K. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296:1821–1825.

[Araki et al., 1996]

Araki N, Johnson MT, Swanson JA. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135: 1249–1260.

[Artelt et al., 1999]

Artelt S, Creutzenberg O, Kock H, Levsen K, Nachtigall D, Heinrich U, Rühle T, Schlögl R. 1999. Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: A model study. *Sci Total EnViron* 228: 219–242.

[Artelt et al., 1998]

Artelt S, Kock H, Nachtigall D, Heinrich U. 1998. Bioavailability of platinum emitted from automobile exhaust. *Toxicol Lett* 96-97: 163–167.

[Asharani et al., 2010]

Asharani PV, Xinyi Ng, Prakash Hande M, Valiyaveetil S. 2010. DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Nanomedicine* 5(1): 51–64.

[Balasubramanian und Burghard, 2005]

Balasubramanian K, Burghard M. 2005. Funktionalisierte Kohlenstoff-Nanoröhren. *Chem unserer Zeit* 39: 16–25.

[Balasubramanian und Burghard, 2006]

Balasubramanian K, Burghard M. 2006. Biosensors based on carbon nanotubes. *Anal Bioanal Chem* 385: 452–468.

[Bang et al., 2004]

Bang JJ, Guerrero PA, Lopez DA, Murr LE, Esquivel EV. 2004. Carbon nanotubes and other nanocrystals in domestic propane and natural gas combustion streams. *J Nanosci Nanotechnol* 4: 716–718.

[Bauerle und Baltimore, 1996]

Bauerle PA, Baltimore D. 1996. NF κ B:ten years after. *Cell* 87: 13–20.

[Bazley und Gullick, 2005]

Bazley LA, Gullick WJ. 2005. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 12: 17–27.

[Berg et al., 2003]

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2003. Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag 5. Auflage.

[Berneburg et al., 2006]

Berneburg M, Kamenisch Y, Krutmann J. 2006. Repair of mitochondrial DNA in aging and carcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 5: 190–198.

[Bethune et al., 1993]

Bethune DS, Klang CH, de Vries MS, Gorman G, Savoy R, Vazquez J, Beyers R. 1993. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with singleatomic- layer walls. *Nature* 363(6430): 605–607.

[Bettmann, 2008]

Bettmann R, Herholz M, Hoffmann EW, Hoffmann U, Kmoch G, Maxin C, Müller E, Schidlowski-Boos S, Söntgerath N. 2008. Innovative Verfahren. Jahresbericht des AAV Altlastensanierungs- und Altlastenaufbereitungsverbandes Nordrhein-Westfalen: 33–38.

[Bianco, 2004]

Bianco A. 2004. Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules. *Expert Opin Drug Deliv* 1(1): 57–65.

[Bienert et al., 2006]

Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Acta* 1758(8): 994–1003.

[Bishop, 1997]

Bishop NE. 1997. An update on non-clathrin coated endocytosis. *Rev Med Virol* 7: 199–207.

[Blanchet et al., 2003]

Blanchet S, Ramgolani K, Baulig A, Marano F, Baeza-Squiban A. 2003. Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 421–427.

[Boiteux, 1993]

Boiteux S. 1993. Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J Photochem Photobiol B* 19(2): 87–96.

[Boiteux et al., 1992]

Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M. 1992. Substrate specificity of the *Escherichia coli* FPG protein (formamidopyrimidine- DNA glycosylase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31: 106–110.

[Boiteux et al., 1990]

Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, Gouyette A, Laval J. 1990. Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ringopened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J Biol Chem* 265: 3916–3922.

[Borm et al., 2006]

Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Kademmann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdörster E. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol 3: 11.

[Bottini et al., 2006]

Bottini M, Cerignoli F, Dawson MI, Magrini A, Rosato N, Mustelin T. 2006. Full-length single-walled carbon nanotubes decorated with streptavidin-conjugated quantum dots as multivalent intracellular fluorescent nanorobes. *Biomacromolecules* 7: 2259–2263.

[Brabec und Kasparovka, 2005]

Brabec V, Kasparovka J. 2005. Modifications of DNA by platinum complexes relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updates* 8: 131–146.

[Bradford, 1976]

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.

[Brodsky et al., 2001]

Brodsky FM, Chen CY, Kneuhl C, Towler MC, Wakeham DE. 2001. Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 517–568.

[Brown et al., 2004]

Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Ston, V. 2004. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(2): 344–353.

[Buchko et al., 2000]

Buchko GW, Hess NJ, Bandaru V, Wallace SS, Kennedy MA. 2000. Spectroscopic studies of Zinc(II)- and Cobalt(II)-associated *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase: extended X-ray absorption fine structure evidence for a metal-binding domain [In Process Citation]. *Biochemistry* 39(40): 12441–12449.

[Buchko et al., 2002]

Buchko GW, Wallace SS, Kennedy MA. 2002. Letter to the Editor: Base excision repair: NMR backbone assignments of *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *J Biomol NMR* 22: 301–302.

[Bund, 2008]

Bund. 2008. Endstation Mensch - aus dem Labor auf den Teller. Die Nutzung der Nanotechnologie im Lebensmittelsektor. Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland. www.kurzlink.de/nanofoodstudie

[Burniston et al., 2004]

Burniston N, Bygott C, Stratton J. 2004. Nano Technology Meets Titanium Dioxide. Surface Coatings International Part A: 179–814.

[Byrne und Baugh, 2008]

Byrne JD, Baugh JA. 2008. The significance of nanoparticles in particle-induced pulmonary fibrosis. *MJM* 11(1): 43–50.

[Cao, 2004]

Cao G. 2004. Nanostructures and Nanomaterials. Imperial College Press.

[Casey et al., 2005]

Casey A, Farrell GF, McNamara M, Byrne HJ, Chambers G. 2005. Interaction of carbon nanotubes with sugar complexes. *Synthetic Metals* 153: 357–360.

[Casey et al., 2007]

Casey A, Davoren M, Herzog E, Lyng F, Byrne H, Chambers G. 2007. Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. *Carbon* 45(1): 34–40.

[Casey et al., 2008]

Casey A, Herzog E, Lyng FM, Byrne HJ, Chambers G, Davoren M. 2008. Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicol Lett* 179: 78–84.

[Chan et al., 1999]

Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401: 616–620.

[Chance et al., 1979]

Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. 2007. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 7(1): 3–18.

[Chance et al., 1979]

Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59(3): 527–605.

[Chaudhry et al., 2008]

Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, Aitken R, Watkins R.

2008. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam* 25(3): 241–258.

[Chen und Mikecz, 2005]

Chen M, von Mikecz A. 2005. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp Cell Res* 305: 51–62.

[Chetsanga et al., 1982]

Chetsanga CJ, Bearie B, Makaroff C. 1982. Alkaline opening of imidazole ring of 7- methylguanosine. 1. Analysis of the resulting pyrimidine derivatives. *Chem Biol Interact* 41(2): 217–233.

[Chlopek et al., 2006]

Chlopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Béguin F. 2006. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* 44: 1106–1111.

[Clark und Brugge, 1995]

EA Clark, JS Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268(5208): 233–239.

[Clark und Manzer, 1972]

Clark HC, Manzer LE. 1973. Reactions of (p-1,5-cyclooctadiene) organoplatinum(II) compounds and the synthesis of perfluoroalkylplatinum complexes. *J. Organomet. Chem.* 59: 411–428.

[Clarke et al., 1999]

Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR. 1999. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem Rev* 99(9): 2511–2534.

[Clarke et al., 1999]

Cassell AM, Franklin NR, Tombler TW, Chan EM, Han J, Dai H. 1999. Directed Growth of Free-Standing Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc* 121(34): 7975–7976.

[Clore et al., 1995]

Clore GM, Ernst J, Clubb R, Omichinski JG, Kennedy WM, Sakaguchi K, Appella E, Gronenborn AM. 1995. Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat Struct Biol* 2: 321–333.

[Collins et al., 1997]

Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stetina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us?. *Mutat Res* 375(2): 183–193.

[Collins, 2004]

Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26(3): 249–261.

[Collins et al., 2008]

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143–151.

[Colognato et al., 2008]

Colognato R, Bonelli A, Ponti J, Farina M, Bergamaschi E, Sabbioni E, Migliore L. 2008. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes *in vitro*. *Mutagenesis* 23(5): 377–382.

[Colvin et al., 1994]

Colvin VL, Schlamp MC, Alivisatos AP. 1994. Light-emitting diodes made from cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer. *Nature* 370: 354–356.

[Conner und Schmid, 2003]

Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37–44.

[Cook et al., 1976]

Cook P, Brazell I, Jost E. 1976. Characterization of nuclear structures containing super-helical DNA. *J Cell Sci* 22(2): 303–324.

[Cooper, 1997]

Cooper AJL. 1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* (Hrsg.: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Kunk LM): 1195–1230, Butterworth-Heinemann, Boston.

[Costa et al., 2005]

Max Costa M, Davidson TL, Chen H, Ke Q, Zhang P, Yan Y, Huang C, Kluz T. 2005. Nickel carcinogenesis: Epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat Res* 592(1-2): 79–88.

[Coste et al., 2004]

Coste F, Ober M, Carell T, Boiteux S, Zelwer C, Castaing B. 2004. Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 279: 44074–44083.

[Cui et al., 2005]

Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. 2005. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* 155(1): 73–85.

[Cveticanin et al., 2010]

Cveticanin J, Joksic G, Leskovac A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O. 2010. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology* 21(1): 015102.

[Dai, 2002]

Dai H. 2002. Carbon nanotubes: synthesis, integration and properties. *Acc Chem Res* 35: 1035–1044.

[Danial und Korsmeyer, 2004]

Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205–219.

[Daughton und Ternes, 1999]

Daughton CG, Ternes TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environ Health Perspect* 6: 907–938.

[Davoren et al., 2007]

Davoren M, Herzog E, Casey A, Cottineau B, Chambers G, Byrne HJ, Lyng FM. 2007. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro* 21(3): 438–448.

[Decker und Lohmann-Matthes, 1988]

Decker T, Lohmann-Matthes ML. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 115(1): 61–69.

[Dempe, 2009]

Dempe J. 2009. Curcumin: Zelluläre Verteilung, Metabolismus und toxische Effekte. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).

[D Erchia et al., 2003]

D’Erchia AM, Tullo A, Pesole G, Saccone C, Sbisà E. 2003. p53 gene family: structural, functional and evolutionary features. *Curr Genomics* 4(1): 13–26.

[Desai et al., 1996]

Desai MP, Labhasehwar V, Amidon GL, Levy RJ. 1996. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharm Re* 13: 1838–1845.

[Ding et al., 2001]

Ding M, Shi X, Lu Y, Huang C, Leonard S, Roberts J, Antonini J, Castranova V, Valiyathan V. 2001. Induction of activator protein-1 through reactive oxygen species by crystalline silica in JB6 cells. *J Biol Chem* 276: 9108–9114.

[Ding et al., 2005]

Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, Cooke PA, Gray JW, Chen FF. 2005. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nanofibers on human skin fibroblast. *Nano Lett* 5(12): 2448–2464.

[Djingova et al., 2003]

Djingova R, Kovacheva P, Wagner G, Markert B. 2003. Distribution of platinum group

elements and other traffic related elements among different plants along some highways in germany. *Sci Total Environ* 308(1-3): 235–246.

[Donaldson et al., 2006]

Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, Alexander A. 2006. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci* 92(1): 5–22.

[Donaldson et al., 2005]

Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V. 2005. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 2(10).

[Don Porto Carero et al., 2001]

Don Porto Carero A, Hoet PH, Verschaeve L, Schoeters G, Nemery B. 2001. Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* 37(2): 155–163.

[Dott et al., 2002]

Dott W, Merk HF, Neuser J, Osieka R. 2002. *Lehrbuch der Umweltmedizin. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.*

[Dybdahl et al., 2004]

Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S, Wallin H. 2004. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles *in vitro* and *in vivo*. *Mutat Res* 562: 119–131.

[Eisenbrand et al., 2005]

Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke F. 2005. *Toxikologie - Für Naturwissenschaftler und Mediziner. Wiley-VCH.*

[Eismann, 2005]

Eismann T. 2005. Identifizierung und Charakterisierung einer Verankerungsdomäne auf dem Tumorsuppressorgen p53, welche für die Inaktivierung durch zytoplasmatische Retention verantwortlich ist. *Dissertation Universität Hamburg.*

[Elder et al., 2007]

Elder A, Yang H, Gwiazda R, Teng X, Thurston S, He H, Oberdörster G. 2007. Testing nanomaterials of unknown toxicity: An example based on platinum nanoparticles of different shapes. *Adv Mater* 19: 3124–3129.

[Ellman, 1959]

Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82(1): 70–77.

[Elstner, 1990]

Elstner EF. 1990. Der Sauerstoff; Biochemie, Biologie, Medizin. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien/Zürich.

[Ely et al., 2001]

Ely JC, Neal CR, Kulpa CF, Schneegurt MA, Seidler JA, Jain JC. 2001. Implications of platinum-group element accumulation along U.S. roads from catalytic converter attrition. *Environ Sci Technol* 35(19): 3816–3822.

[Ely et al., 1999]

Ely J, Neal CR, O'Neill JA, Jain JC. 1999. Quantifying the platinum group elements (pges) and gold in geological samples using cation exchange pretreatment and ultrasonic nebulization inductively coupled plasma-mass spectrometry (usn-icpms). *Chemical Geology* 157: 219–234.

[Endo et al., 2005]

Endo M, Muramatsu H, Hayashi T, Kim YA, Terrones M, Dresselhaus MS. 2005. Nanotechnology: 'buckypaper' from coaxial nanotubes. *Nature* 433(7025): 476.

[EU, 2009]

EU. 2009. Verordnung über kosmetische Mittel (Kosmetikverordnung). Amtsblatt der europäischen Union Nr. L152, S.1, Nr. L216. S.3.

[Ewen et al., 1993]

Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. 1993. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: 487–497.

[FAO und WHO, 2009]

FAO und WHO. 2009. Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications. Meeting Report.

[Fenech, 2000]

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455(1-2): 81–95.

[Fernandez-Garcia und Rodriguez, 2007]

Fernandez-Garcia M, Rodriguez JA. 2007. Metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials*: Brookhaven National Laboratory. P.O. Box 5000 Upton, NY 11973-5000 www.bnl.gov.

[Fiedeler et al., 2008]

Fiedeler U, Simkó M, Gázsó A, Nentwich M. 2008. Zur Definition der Nanotechnologie. *Nano Trust-Dossier* 1: 1–4.

[Fiorito et al., 2006]

Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P. 2006. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon* 44: 1100–1105.

[Filomeni et al., 2002]

Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. 2002. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol* 64: 1057–1064.

[Flahaut et al., 2006]

Flahaut E, Durrieu MC, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Baquey C. 2006. Study of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes. *J Mater Sci* 41: 2411–2416.

[Flegentreu, 2008]

Flegentreu M. 2008. Die Chemie hat das Potenzial der Kohlenstoffnanoröhrchen erkannt.

[Fleger et al., 1995]

Fleger, Heckman, Klomparens. 1995. *Elektronenmikroskopie*, Spektrum, Akademischer Verlag 1. Auflage.

[Feng et al., 2005]

Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. 2005. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem* 280(30): 27888–95.

[Flores et al., 2003]

Flores AB, Robles LA, Arias MO, Ascencio JA. 2003. Small metal nanoparticle recognition using digital image analysis and high resolution electron microscopy. *Micron* 34: 109–118.

[Foged et al., 2005]

Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. 2005. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 298(2): 315–322.

[Foley et al., 2002]

Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C. 2002. Cellular localisation of water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 116–119.

[Ford et al., 2002]

Ford T, Graham J, Rickwood D. 2002. Iodixanol: A Nonionic Iso-osmotic Centrifugation Medium for the Formation of Self-Generated Gradients. *Anal Biochem* 220(2): 360–366.

[Forman et al., 2009]

Forman H J, Zhang H, Rinna A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 1–12.

[Friling et al., 1990]

Friling RS, Bensimon A, Tichauer Y, Daniel V. 1990. Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci* 87: 6258–6262.

[Frosina, 2006]

Frosina G. 2006. Prophylaxis of oxidative DNA damage by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Int J Cancer* 119(1): 1–7.

[Gagnon et al., 2006]

Gagnon ZE, Newkirk C, Hicks S. 2006. Impact of platinum group metals on the environment: A toxicological, genotoxic and analytical chemistry study. *J Environ Sci Health A* 41: 397–474.

[Garrido et al., 2008]

Garrido GI, Patcas FC, Upper G, Türk M, Yilmaz S, Kraushaar-Czarnetzki B. 2008. Supercritical deposition of Pt on SnO₂-coated Al₂O₃ foams: Phase behaviour and catalytic performance. *Appl Catal A* 338: 58–65.

[Geiser et al., 2005]

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytotic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 113: 1555–1560.

[Gekle et al., 2010]

Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Markwardt F, Klöcker N, Baumann R, Marti Hugo. 2010. *Taschenlehrbuch Physiologie*. Georg Thieme Verlag KG.

[Gerde et al., 2001]

Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Tesfaigzi Y, Dahl AR. 2001. Respiratory epithelial penetration and clearance of particle-born benzo[a]pyrene. *Res Rep Health Eff Inst* 101: 5–25.

[Giessibl, 2003]

Giessibl FJ. 2003 Advances in atomic force microscopy. *Rev Mod Phys* 75(3): 949–983.

[Gilmour et al., 1996]

Gilmour PS, Brown, DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K. 1996. Adverse health effects of PM₁₀ particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med* 53(12): 817–822.

[Godbey et al., 1999]

Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. 1999. Tracking and intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5177–5181.

[Goldman et al., 2006]

Goldman ER, Medintz IL, Mattoussi H. 2006. Luminescent quantum dots in immunoassays. *Anal Bioanal Chem* 384(3): 560–563.

[Goldstein et al., 1992]

Goldstein AN, Echer CM, Alivisatos AP. 1992. Melting in Semiconductor Nanocrystals. *Science* 256: 1425–1427.

[Gomez et al., 2002]

Gomez B, Palacios MA, Gomez M, Sanchez JL, Morrison G, Rauch S, McLeod C, Ma R, Caroli S, Alimonti A, Petrucci E, Bocca B, Schramel P, Zischka M, Petterson C, Wass U. 2002. Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities. *Sci Total Environ* 299 (1-3): 1–19.

[Graham et al., 2005]

Graham AP, Duesberg GS, Seidel RV, Liebau M, Unger E, Pamler W, Kreupl F, Small WH. 2005. Carbon nanotubes for microelectronics? *Small* 1 (4): 382–390.

[Grasselli und Bulkin, 1991]

Grasselli JG, Bulkin BJ. 1991. Analytical Raman Spectroscopy. Band 114 von Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications. Wiley-Interscience.

[Gray und Carmichael, 1992]

Gray B, Carmichael AJ. 1992. Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. *Biochem J* 281(Pt 3): 795–802.

[Griffith, 1980]

Griffith OW. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106(1): 207–212.

[Grollman und Moriya, 1993]

Grollman AP, Moriya M. 1993. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet* 9(7): 246–249.

[Grubek-Jaworska et al., 2006]

Grubek-Jaworska H, Nejman P, Czuminska K, Przybyowski T, Huczko A, Lange H. 2006 Preliminary results on the pathogenic effects if intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons. *Carbon* 44(6) :1057.

[Gryaznov und Trusov, 1993]

Gryaznov VG, Trusov LI. 1993. Size effects in micromechanics of nanocrystals. *Prog Mater Sci* 37: 289–401.

[Guha und Bhattacharyya, 1997]

Guha S, Bhattacharyya B. 1997. The colchicine-tubulin interaction: a review. *Current Science* 73(4): 351–358.

[Gullick, 2001]

Gullick WJ. 2001. The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer* 8: 75–82.

[Gurr et al., 2005]

Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, Jan KY. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213(1-2): 66–73.

[Halll, 1999]

Hall AG. 1999. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 29: 238–245.

[Halliwell, 2002]

Halliwell B. 2002. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic Biol Med* 32(10): 968–974.

[Halliwell, 2006]

Halliwell B. 2006. Reaktive species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2): 312–322.

[Halliwell und Gutteridge, 1999]

Halliwell B, Gutteridge, JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.

[Hansen et al., 1993]

Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B. 1993. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* 121: 61–72.

[Hartwig, 2002]

Hartwig A. 2002. Role of DNA repair in particle- and fiber-induced lung injury. *Inhal Toxicol* 14: 91–100.

[Heddle et al., 2001]

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P,

MacGregor JT. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environ Mol Muta* 18: 277–291.

[Helland et al., 2007]

Helland A, Wick P, Koehler A, Schmid K, Som C. 2007. Reviewing the Environmental and Human Health Knowledge Base of Carbon Nanotubes. *Environ Health Perspect* 115(8): 1125–1131.

[Helton und Chen, 2007]

Helton ES, Chen X. 2007. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100: 883–896.

[Hennrich, 2000]

Hennrich F. 2000. Spektroskopie an Fullerenen, Fullerendimeren und Kohlenstoffnanoröhren. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH).

[Hennrich et al., 2007]

Hennrich F, Krupke R, Arnold K, Rojas Stuetz JA, Lebedkin S, Koch T, Schimmel T, Kappes MM. 2007. The Mechanism of Cavitation-Induced Scission of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Phys Chem B* 111: 1932–1937.

[Henzler und Steudle, 2000]

Henzler T, Steudle E. 2000. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J Exp Bot* 51(353): 2053–2066.

[Hinds et al., 1992]

Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. 1992. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70: 993–1006.

[Hinze, 1998]

Hinze P. 1998. Elektronenstrahlolithographie mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop Philips CM 200 FEG / Physikalisch- Technische Bundesanstalt. Braunschweig, Laborbericht.

[Hoeijmakers, 2001]

Hoeijmakers JHJ. 2001. Genome Maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366–374.

[Holleman und Wiberg, 1995]

Holleman A, Wiberg N. 1995. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Walter de Gruyter 101. Auflage.

[Höning et al., 1994]

Höning S, G Kreimer, H Robenek, BM Jockusch. 1994. Receptor-mediated endocytosis is sensitive to antibodies against the uncoating ATPase (hsc70). *J Cell Sci* 107:1185.

[Höpker et al., 2007]

Höpker K, Wurster U, Kunigkeit G, Ott G. 2007. Anwendung von Nanopartikeln. LUBW, Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg: 1–38.

[Hoshino et al., 2004]

Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M. 2004. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol Immunology* 48: 985–994.

[Huang et al., 2002]

Huang H C, Nguyen T, Pickett CB. 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. *J Biol Chem* 277(45): 42769–42774.

[Huang et al., 1994]

Huang X, Zhuang Z, Frenkel K, Klein CB, Costa M. 1994. The role of nickel and nickel-mediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 102(3): 281–284.

[Huczko und Lange, 2001]

Huczko A, Lange H. 2001. Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerene Sci Tech* 9(2): 247–250.

[Huczko et al., 2005]

Huczko A, Lange H, Bystrzejewski M, Baranowski. 2005. Pulmonary toxicity of 1-D nanocarbon materials. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct* 13: 141–145.

[Huczko et al., 2001]

Huczko A, Lange H, Calko E, Jaworska HG, Droszcz P. 2001. Physiological testing of carbon nanotubes: Are they asbestos like?. *Fullerene Sci Tech* 9: 251–254.

[Hussain et al., 2007]

Hussain SM, Hess KL, Gearhart, JM, Geiss KT, Schlager JJ. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in brl 3a rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 19(7): 975–983.

[Ibald-Mulli et al., 2002]

Ibald-Mulli A, Wichmann H-E, Kreyling W, Peters A. 2002. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 15(2): 189–201.

[Iijima, 1991]

Iijima S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56–58.

[Incera Garrido et al., 2008]

Incera Garrido G, Patcas FC, Upper G, Türk M, Yilmaz S, Kraushaar-Czarnetzki B. 2008. Supercritical deposition of Pt on SnO₂-coated Al₂O₃ foams: Phase behaviour and catalytic performance. Appl Catal A 338: 58–65.

[Irie et al., 1992]

Irie T, Fukunaga K, Pitha J. 1992. Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use: I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers *in vitro*. J Pharm Sci 81: 521–523.

[Isobe et al., 1986]

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. 1986. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature 320: 84–85.

[Ispas et al., 2009]

Ispas C, Andreescu D, Avni P, Goia DV, Andreescu S, Wallace KN. 2009. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish. Environ Sci Technol 43: 6349–6356.

[Ivanov, 2008]

Ivanov AI. 2008. Exocytosis and Endocytosis. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC.

[Jacobsen et al., 2008]

Jacobsen NR, Pojana G, White P, Møller P, Cohn CA, Korsholm KS, Vogel U, Marcomini A, Loft S, Wallin H. 2008. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C60 fullerenes in the FE1-MutaTM Mouse lung epithelial cells. Environmental and Molecular Mutagenesis 49(6): 476–487.

[Jakubowski und Bartosz, 2000]

Jakubowski W, Bartosz G. 2000. 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: What does it measure. Cell Biol Int 24: 757–760.

[Jamieson und Lippard, 1999]

Jamieson ER, Lippard SJ. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. Chem Rev 99(9): 2467–98.

[Jani et al., 1990]

Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. J Pharm Pharmacol 42(12): 821–826.

[Janus et al., 1999]

Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W. 1999. Diffe-

rent regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequencespecific DNA binding. *Mol Cell Biol* 19: 2155–2168.

[Jeffrey et al., 1995]

Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. 1995. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267: 1498–1502.

[Jia et al., 2005]

Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, Zhao Y, Guo X. 2005. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol* 39(5): 1378–1383.

[Jiang et al., 2006]

Jiang P, Du W, Heese K, Wu M. 2006. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 26: 9071–9082.

[Jin et al., 2009]

Jin H, Heller DA, Sharma R, Strano MS. 2009. Size-Dependent Cellular Uptake and Expulsion of Single-Walled Carbon Nanotubes: Single Particle Tracking and a Generic Uptake Model for Nanoparticles. *ACS Nano* 3(1): 149–158.

[Johnson et al., 1997]

Johnson SW, Laub PB, Beesley JS, Ozols RF, Hamilton TC. 1997. Increased platinum-DNA damage tolerance is associated with cisplatin resistance and cross-resistance to various chemotherapeutic agents in unrelated human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 57: 850–856.

[Kagan et al., 2006]

Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, Konduru NV, Potapovich AI, Osipov AN, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Mercer R, Castranova V, Shvedova AA. 2006. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicol Lett* 165(1): 88–100.

[Kajita et al., 2007]

Kajita M, Hikosaka K, Litsuka M, Kanayama A, Toshima N, Miyamoto Y. 2007. Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 41(6): 615–626.

[Kalinich et al., 1997]

Kalinich JF, Ramakrishnan N, McClain DE. 1997. The antioxidant Trolox enhances the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to 2',7'-dichlorofluorescein. *Free Radic Res* 26(1): 37–47.

[Kalweit et al., 1999]

Kalweit S, Utesch D, von der Hude W, Madle S. 1999. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells-comparison of three different test approaches. *Mutat Res* 439(2): 183–190.

[Kam und Dai, 2005]

Kam NWS, Dai H. 2005. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J Am Chem Soc* 127(16): 6021–6026.

[Kam et al., 2005]

Kam NWS, Liu Z, Dai H. 2005. Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway. *Angew Chem Int Ed* 44: 1–6.

[Kam et al., 2005b]

Kam NWS, O'Connell M, Wisdom JA, Dai H. 2005b. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11600–11605.

[Karin et al., 1997]

Karin M, Liu Z, Zandi E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240–246.

[Kasai et al., 2000]

Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Moric H. 2000. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol* 38(5): 467–471.

[Kensler et al., 2007]

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1- Nrf2 -ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 47: 89–116.

[Kern et al., 2004]

Kern K, Wöhrle-Knirsch JM, Krug HF. 2004. Nanonoxes: Nanoparticle uptake, transport and toxic. *Signal Transduction* 149: 3–4.

[Kern, 2006]

Kern M. 2006. Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch Apfelpolyphenole und deren mikrobielle Abbauprodukte in humanen Kolonkarzinomzellen. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.

[Kessel et al., 2002]

Kessel M, Liu SX, Xu A, Santella R, Hei TK. 2002. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 234-235: 301–308.

[Kim et al., 2005]

Kim Y-M, Reed W, Lenz AG, Jaspers I, Silbajoris R, Nick HS, Samet JM. 2005. Ultra-fine carbon particles induce interleukin-8 gene transcription and p38 MAPK activation in normal human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L432–441.

[Kirsch-Volders et al., 2000]

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Lorge E, Norppa H, Surralles J, von der Hude W, Wakata A. 2000. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ Mol Mutagen* 35(3): 167–172.

[Kisin et al., 2007]

Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova AA. 2007. Single-walled Carbon Nanotubes: Geno- and Cytotoxic Effects in Lung Fibroblast V79 Cells. *J Toxicol Environ Health A* 70(24): 2071–2079.

[Klingeler et al., 2007]

Klingeler R, Kramberger C, Müller C, Pichler T, Leonhardt A, Büchner B. 2007. Funktionalisierte Kohlenstoffnanoröhren: Materialforschung in der Nanowelt. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Technischen Universität Dresden* 56 Heft 1-2.

[Klotz, 2002]

Klotz LO. 2002. Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem* 383(3-4): 443–456.

[Knaapen et al., 2004]

Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. 2004. Inhaled particles and lung cancer, part A. Mechanisms. *Int J Cancer* 109: 799–809.

[Knebel und Widmer, 2009]

Knebel S, Widmer M. 2009. Nano-Food: Designer-Food oder Desaster – Was uns die Nanotechnologie im Lebensmittelsektor bringt. Februar-Newsletter der Innovationsgesellschaft, St. Gallen, Schweiz markus.widmer@innovationsgesellschaft.ch

[Koller, 2004]

Koller U. 2004. Katalysatoren in Kraftfahrzeugen – Freund oder Feind für Umwelt und Gesundheit?. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in der Helmholtz-Gemeinschaft. Fachinformationsdienst Lebenswissenschaften Umwelt und Gesundheit.

[Konaka et al., 1999]

Konaka R, Kasahara E, Dunlap WC, Yamamoto Y, Chien KC, Inoue M. 1999. Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion. *Free Radical Biol Med* 27: 294–300.

[Kooy et al., 1997]

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. 1997. Oxidation of 2',7'- dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res* 27: 245–254.

[Kostarelos et al., 2007]

Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Luangsivilay J, Godefroy S, Pantarotto D, Briand JP, Muller S, Prato M, Bianco A. 2007. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat Nanotechnol* 2: 108–113.

[Kreyling et al., 2002]

Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A. 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* 65(20): 1513–1530.

[Kreyling et al., 2006]

Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Möller W. 2006. *Nanomaterials - Toxicity, Health and Environmental Issues* (Kumar, C., Hrsg.), Kap. Dosimetry, Epidemiology and Toxicology of Nanoparticles. Wiley-VCH 1. Auflage.

[Krug, 2005]

Krug HF. Auswirkungen nanotechnischer Entwicklungen auf die Umwelt. 2005. UWSF – Z. Umweltchem Ökotox 17(4): 223–230.

[Krug et al., 2007]

Krug HF, Diabaté S, Wörle-Knirsch JM, Mülhopt S, Paur HR. 2007. Synthetische Nanopartikel am Arbeitsplatz und in der Umwelt. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 42(1): 4–14.

[Krug et al., 2006]

Krug HF, Kern K, Wörle-Knirsch JM, Diabaté S. 2006. *Nanomaterials - Toxicity, Health and Environmental Issues* (Kumar, C., Hrsg.), Kap. Toxicity of nanomaterials - new carbon conformations and metal oxides. Wiley-VCH.

[Kruis et al., 1998]

Kruis FE, Fissan H, Peled A 1998. Synthesis of Nanoparticles in the Gas Phase for Electronic, Optical and Magnetic Applications. *J Aerosol Sci* 29: 511–535.

[Kubbutat et al., 1997]

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387: 299–303.

[Kumar, 2006]

Kumar C. 2006. *Nanomaterials - Toxicity, Health and Environmental Issues*. WILEY-VCH 1. Auflage.

[Kümmerer et al., 1999]

Kümmerer K, Helmers E, Hubner P, Mascart G, Milandri M, Reinthaler F, Zwakenberg M. 1999. European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources. *Sci Total Environ* 225(1-2):155–165.

[Kümmerer et al., 2009]

Kümmerer K, Schuster A, Haiss A, Günther A, Jacobs J. 2009. Umweltrisikobewertung von Zytostatika. *Forschungsbericht* 360 14 004.

[Kurzhaus, 2003]

Kurzhaus HA. 2003. *Lexikon Lebensmitteltechnik*. B Behr's Verlag GmbH & Co. KG 1. Auflage.

[Lademann et al., 1999]

Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. 1999. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12(5): 247–256.

[Lagana et al., 2000]

Lagana A, Vadnais J, Le PU, Nguyen TN, Laprade R, Nabi IR, Noel J. 2000. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na^+/H^+ exchanger NHE1. *J Cell Sci* 113: 3649–3662.

[Lam et al., 2006]

Lam CW, James JT, McCluskey R, Arepalli S, Hunter RL. 2006. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol* 36: 189–217.

[Lam et al., 2002b]

Lam CW, James JT, Latch JN, R, Hamilton RF, Hollan A. 2002. Pulmonary toxicity of stimulated lunar and Martian dusts in mice. II. Biomarkers of acute responses after intratracheal instillation. *Inhal Toxicol* 14: 917–928.

[Lam et al., 2004a]

Lam CW, James JT, McCluskey R, Cowper S, Murocacho C. 2002. Pulmonary toxicity of stimulated lunar and Martian dusts in mice. I. Histopathology 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Inhal Toxicol* 14: 901–919.

[Lam et al., 2004]

Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. 2004. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* 77(1): 126–134.

[Lane, 1992]

Lane DP. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381): 15–16.

[Lange, 1992]

Lange Y. 1992. Tracking cell cholesterol with cholesterol oxidase. *J Lipid Res* 33: 315–321.

[Lao und Laufs, 2005]

Lao JK, Laufs U. 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 89–118.

[Laschka et al., 1996]

Laschka D, Striebel T, Daub J, Nachtwey M. 1996. Platin im Regenabfluss einer Straße. *Zeitung für Umweltchemische Ökotoxikologie* 8: 124–129.

[Lau et al., 2008]

Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 58(5-6): 262–270.

[Laval, 1996]

Laval J. 1996. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol* 44: 14–24.

[Laval et al., 1991]

Laval J, Lopes F, Madelmont JC, Godeneche D, Meyniel G, Habraken Y, O'Connor TR, Boiteux S. 1991. Excision of imidazole ring-opened N7-hydroxyethylguanine from chloroethylnitrosourea-treated DNA by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *IARC Sci Publ* 105: 412–416.

[Lebedkin et al., 2002]

Lebedkin S, Schweiss P, Renker B, Malik S, Hennrich F, Neumaier M, Stoermer C, Kappes M. 2002. Single-wall carbon nanotubes with diameters approaching 6 nm obtained by laser vaporization. *Carbon* 40: 417–423.

[LeBel et al., 1992]

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* 5(2): 227–231.

[Lee et al., 2003]

Lee HJ, Yeo SY, Jeong SH. 2003. Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. *J Mater Sci* 38: 2199–2204.

[Lehmann, 2002]

Lehmann L. 2002. Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial von Substanzen mit estrogenen Wirkung. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).

[Lenz, 2006]

Lenz M. 2006. Zytostatische Effekte von Pt(IV)-Chlorid auf Zellstämme aus Leber und Nierengewebe, PhD thesis, Dissertation, medizinische Fakultät Universität Tübingen.

[Leong et al., 1986]

Leong M, Milstein C, Pannell R. 1986. Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots. *J Histochem Cytochem* 34: 1645–1650.

[Lesniak et al., 2005]

Lesniak W, Bielinska AU, Sun K, Janczak KW, Shi X, Baker JR, Balogh LP. 2005. Silver/dendrimer nanocomposites as biomarkers: fabrication, characterization, in vitro toxicity, and intracellular detection. *Nano Lett* 5(11): 2123–2130.

[Levy et al., 1995]

Levy E, Mehran M, Seidman E. 1995. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Faseb J* 9(8): 626–35.

[Li et al., 2003]

Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111: 455–460.

[Li et al., 2007]

Li Y, Huang XJ, Heo SH, Li CC, Choi YK, Cai WP, Cho SO. 2007. Superhydrophobic bionic surfaces with hierarchical microsphere/SWCNT composite arrays. *Langmuir* 23(4): 2169–2174.

[Li et al., 2007a]

Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young SH, Shvedova A, Luster M, Simeonova PP. 2007. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Perspect* 115: 377–382.

[Li et al., 1997]

Li Q, Laval J, Ludlum DB. 1997. Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis* 18(5): 1035–1038.

[Limbach et al., 2005]

Limbach LK, Li Y, Grass RN, Brunner TJ, Hintermann MA, Muller M, Gunther D, Stark WJ. 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol* 39: 9370–9376.

[Limbach et al., 2007]

Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinik A, Stark WJ. 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol* 41: 4158–4163.

[Lin et al., 2005]

Lin HT, Huang TP, Liu YL, Yeh CC, Lai YH, Hung WH. 2005. Adsorption and thermal reactions of alkanethiols on Pt(111): Dependence on the length of the alkyl chain. *J Phys Chem* 109: 14079–14084.

[Lindberg et al., 2009]

Lindberg HK, Falck GCM, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa H. 2009. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett* 186(3): 166–173.

[Lindl, 2002]

Lindl T. 2002. Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag 5 Auflage.

[Liochev und Fridovich, 1994]

Liochev SI, Fridovich I. 1994. The role of $\text{O}_2^{\bullet-}$ in the production of $\text{OH}^\bullet$: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 16(1): 29–33.

[Liu et al., 1994]

Liu M, Dhanwada KR, Birt DF, Hecht S, Pelling JC. 1994. Increase in p53 protein halflife in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* 15: 1089–1092.

[Liu et al., 2007]

Liu X, Gurel V, Morris D, Murray DW, Zhitkovich A, Kane AB, Hurt RH. 2007. Bio-availability of Nickel in Single-Wall Carbon Nanotubes. *Adv Mater* 19: 2790–2796.

[Lohbach et al., 2006]

Lohbach C, Neumann D, Lehr CM, Lamprecht A. 2006. Human vascular endothelial cells in primary cell culture for the evaluation of nanoparticle bioadhesion. *J Nanosci Nanotechnol* 6: 3303–3309.

[Lu et al., 1996]

Lu X, Burbidge SA, Griffin S, Smith HM. 1996. Discordance between accumulated p53 protein level and its transcriptional activity in response to u.v. radiation. *Oncogene* 13: 413–418.

[Lucarelli et al., 2004]

Lucarelli M, Gatti AM, Savarino G, Quattroni P, Martinelli L, Monari E, Boraschi D. 2004. Innate defence functions of macrophages can be biased by nanosized ceramic and metallic particles. *Eur Cytokine Netw* 15(4): 339–346.

[Lüllmann-Rauch, 2003]

Lüllmann-Rauch R. 2003. Taschenlehrbuch Histologie. Thieme 2. Auflage.

[Lustig et al., 1997a]

Lustig S, Zang S, Michalka B, Schramel P, Beck W. 1997. Platinum determination in

nutrient plants by inductively coupled plasma mass spectrometry with special respect to the hafnium oxide interference. *Fresenius J Anal Chem* 357: 157–1163.

[Lustig et al., 1998]

Lustig S, Zang S, Michalka B, Schramel P, Beck W. 1998. Dissolution of metallic platinum as water soluble species by naturally occurring complexing agents. *Microchim Acta* 129: 189–194.

[Luther, 2004]

Luther W. 2004. Industrial application of nanomaterials - chances and risks. *Future Technologies* 54: 43–75.

[MacDonald et al., 2005]

MacDonald RA, Laurenzi BF, Viswanathan G, Ajayan PM, Stegemann JP. 2005. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 74(3): 489–496.

[Manna et al., 2005]

Manna SK, Sarkar S, Barr J, Wise K, Barrera EV, Jejelowo O, Rice-Ficht AC, Ramesh GT. 2005. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor. κ B in human keratinocytes. *Nano Lett* 5(9): 1676–1684.

[Marchesi et al., 1999]

Marchesi E, Rota C, Fann YC, Chignell CF, Mason RP. 1999. Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-Dichlorofluorescein: A spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 26: 148–161.

[Marengo et al., 2008]

Marengo B, Ciucis CD, Verzola D, Pistoia V, Raffaghello L, Patriarca S, Balbis E, Traverso N, Cottalasso D, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. 2008. Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic Biol Med* 44(3): 474–482.

[Marnett et al., 2003]

Marnett LJ, Riggins JN, West JD. 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111(5): 583–593.

[Marquardt und Schäfer, 2004]

Marquardt H, Schäfer S. 2004. *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

[Maynard et al., 2004]

Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V. 2004. Exposure

to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A* 67(1): 87–108.

[Mehta und Siddik, 2009]

Mehta K, Siddik ZH. 2009. *Drug Resistance in Cancer Cells*. Springer Science+Business Media, LLC.

[Meili et al., 2007]

Meili C, Widmer M, Husmann F, Gehr P, Blank F, Riediker M, Schmid K, Stark W, Limbach L. 2007. *Synthetische Nanomaterialien. Risikobeurteilung und Risikomanagement. Grundlagenbericht zum Aktionsplan. Umwelt-Wissen Nr. 721, Bundesamt für Umwelt (BAFU) und Bundesamt für Gesundheit (BAG), Bern, www.umwelt-schweiz.ch/uw-0721-d.*

[Meister und Anderson, 1983]

Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52: 711–760.

[Menge, 1967]

Menge H. 1967. *Menge-Güthling: Langenscheidts Großwörterbuch der griechischen und deutschen Sprache*. Berlin 20. Auflage.

[Merchan-Merchan et al., 2003]

Merchan-Merchan W, Saveliev AV, Kennedy LA. 2003. Carbon nanostructures in opposed-flow methane oxy-flames. *Combust Sci Technol* 175: 2217–2236.

[Migliore et al., 2002]

Migliore L, Frenzilli G, Nesti C, Fortaner S, Sabbioni E. 2002. Cytogenetic and oxidative damage induced in human lymphocytes by platinum, rhodium and palladium compounds. *Mutagenesis* 17: 411–417.

[Miller et al., 1998]

Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. 1998. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt- Mutations-forschung. Mutat Res* 410(1): 81–116.

[Mineo und Anderson, 2001]

Mineo C, Anderson RG. 2001. Potocytosis. Robert Feulgen Lecture. *Histochem Cell Biol* 116: 109–18.

[Miyashita und Reed, 1995]

Miyashita T, Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293–299.

[Momand et al., 2000]

Momand J, Wu HH, Dasgupta G. 2000. MDM2–master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242: 15–29.

[Monteiller et al., 2007]

Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* 64(9): 609–615.

[Monteiro-Riviere et al., 2005]

Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. 2005. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett* 155: 377–384.

[Monteiro-Riviere und Tran, 2007]

Monteiro-Riviere NA, Tran CL. 2007. Nanotoxicology - Characterization, Dosing and Health Effects. Informa Healthcare USA.

[Moore et al., 1997]

Moore A, Weissleder R, Bogdanov AJ. 1997. Uptake of dextrancoated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging* 7: 1140–1145.

[Morjan et al., 2002]

Morjan RE, Nerushev OA, Sveningsson M, Falk LKL, Rohmund F, Campbell EEB. 2002. Parametric study of nanotube growth from C₂H₂ and C₆₀ on supported iron catalyst particles. *Am Inst Physics Conf Proc* 633: 186–189.

[Morland et al., 2002]

Morland I, Rolseth V, Luna L, Rognes T, Bjoras M, Seeberg E. 2002. Human dna glycosylases of the bacterial fpg/mutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in dna. *Nucleic Acids Research* 30(22): 4926–4936.

[Mosmann, 1983]

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55–63.

[Mosner et al., 1995]

Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F, Deppert W. 1995. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *Embo J* 14: 4442–4449.

[Mousavi et al., 2004]

Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekshus R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377: 1–16.

[Mroz et al., 2007]

Mroz RM, Schins RP, Li H, Drost EM, Macnee W, Donaldson K. 2007. Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NFkappaB DNA binding in lung epithelial A549 cell line. *J Physiol Pharmacol* 5: 461–470.

[Muller et al., 2005]

Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D. 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol* 207(3): 221–231.

[Muller et al., 2008]

Muller J, Decordier I, Hoet PH, Lombaert1 N, Thomassen L, Huaux F, Lison D, Kirsch-Volders M. 2008. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 29(2): 427–433.

[Müller et al., 2008]

Müller M, Fritz A, Buchter A. 2008. Nanotoxikologie. *Zbl Arbeitsmed* 58: 238–252.

[Mühlfeld et al., 2008]

Mühlfeld C, Rothen-Rutishauser B, Blank F, Vanhecke D, Ochs M, Gehr P. 2008. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L817–L829.

[Murphy, 2009]

Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1): 1–13.

[Murr et al., 2004b]

Murr LE, Bang JJ, Esquivel EV, Guerrero PA, Lopez DA. 2004. Carbon nanotubes, nanocrystal form, and complex nanoparticle aggregates in common fuel-gas combustion sources and the ambient air. *J Nanopart Res* 6(2): 241–251.

[Murr et al., 2004a]

Murr LE, Bang JJ, Lopez DA, Guerrero PA, Esquivel EV, Choudhuri AR, Subramanya M, Morandi M, Hollan A. 2004. Carbon nanotubes and nanocrystals methane combustion and the environmental applications. *J Mater Sci* 39: 2199–2204.

[Murr et al., 2005]

Murr LE, Garza KM, Soto KF, Carrasco A, Powell TG, Ramirez DA, .2005. Catotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Int Environ Res Public Health* 2(1): 31–42.

[Muralidhar et al., 1996]

Muralidhar S, Doniger J, Mendelson E, Araujo JC, Kashanchi F, Azumi N, Brady JN,

Rosenthal LJ. 1996. Human cytomegalovirus mtrII oncoprotein binds to p53 and down-regulates p53-activated transcription. *J Virol* 70: 8691–8700.

[Mutschler et al., 2001]

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. 2001. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

[Myhre et al., 2003]

Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65(10): 1575–1582.

[Nel et al., 2006]

Nel A, Xia T, Madler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622–627.

[Nelson und Cox, 2006]

Nelson DL, Cox MM. 2001. *Lehninger Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

[Nelson und Kastan, 1994]

Nelson WG, Kastan M. 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 14(3): 1815–1823.

[Ness et al., 2003]

Ness JM, Akhtar RS, Latham CB, Roth KA. 2003. Combined Tyramide Signal Amplification and Quantum Dots for Sensitive and Photostable Immunofluorescence Detection. *J Histochem Cytochem* 51(8): 981–987.

[Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001]

Nichols B J, Lippincott-Schwartz J. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11: 406–412.

[Niederberger, 2004]

Niederberger M. 2004. Metalloxide - Nanopartikel mit besonderen Eigenschaften. <http://www.laborpraxis.vogel.de/articles/106377/>, 11.07.2010, 19:32.

[Nguyen et al., 2004]

Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 37(4): 422–441.

[Nguyen et al., 2003]

Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. 2003. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the anti-

oxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 278: 4536–4541.

[Nguyen et al., 2005]

Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB. 2005. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* 280(37): 32485–32492.

[Oberdörster, 2004]

Oberdörster E. 2004. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* 112: 1058–1062.

[Oberdörster et al., 1994]

Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102: 173–179.

[Oberdörster et al., 2005a]

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005a. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7): 823–839.

[Oberdörster et al., 2005b]

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005b. Nanotoxikology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles - supplemental web sections. *Environ Health Perspect* 113: 823–839.

[Oberdörster et al., 2005c]

Oberdörster E, Ortiz-Acevedo A, Xie H, Pantano P, Baughman RH, Musselman IH, Draper RK. 2005. Exposure of fathead minnow to fullerene and single-walled carbon nanotubes [Abstract]. *Off J Soc Toxicol* 84(S1): 325.

[Oberdörster et al., 2002]

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* 65: 1531–1543.

[Oberdörster et al., 2007]

Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 1: 2–25.

[Oestling und Johanson, 1984]

Oestling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 291–298.

[Offer et al., 1999]

Offer H, Wolkowicz R, Matas D, Blumenstein S, Livneh Z, Rotter V. 1999. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett* 450: 197–204.

[Olayioye et al., 2000]

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19: 3159–67.

[Oller et al., 1997]

Oller AR, Costa M, Oberdörster G. 1997. Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 143: 152–166.

[Onizawa et al., 2009]

Onizawa S, Aoshiba K, Kajita M, Miyamoto Y, Nagai A. 2009. Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 340–349.

[Oren, 1985]

Oren M. 1985. The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823: 67–78.

[Ott und Gust, 2006]

Ott I, Gust R. 2006. Special qualities of inorganic cytostatics. medicinal chemistry of platinum complexes. *Pharm Unserer Zeit* 35(2): 124–133.

[Pacurari et al., 2008]

Pacurari M, Yin XJ, Zhao J, Ding M, Leonard SS, Schwegler-Berry D, Ducatman BS, Sbarra D, Hoover MD, Castranova V, Vallyathan V. 2008. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF- κ B and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect* 116(9): 1211–1217.

[Panarotto et al., 2004]

Panarotto D, Singh R, McCathy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, Kostarelos K, Bianco A. 2004. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Ed* 43: 5242–5246.

[Pante und Kann, 2002]

Pante N, Kann M. 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of ~ 39 nm. *Mol Biol Cell* 13: 425–434.

[Pallardó et al., 2009]

Pallardó FV, Markovic J, García JL, Viña J. 2009. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 77–85.

[Park, 2007]

Park B. 2007. Nanotechnology: Consequenses for human health and enviroment. The Royal Society of Chemistry.

[Paschen et al., 2004]

Paschen H, Coenen C, Fleischer T, Grünwald R, Oertel D, Revermann C. 2004. Nanotechnology, Springer-Verlag, Berlin 1. Auflage.

[Pastorin et al., 2006]

Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Briand JP, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. 2006. Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. Chem Commun (Camb) (11): 1182–1184.

[Pauluhn, 2009]

Pauluhn J. 2009. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: Toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. Toxicol Sci doi: 10.1093/toxsci/kfp046 advance access publication.

[Paur et al., 2008]

Paur HR, Mühlhopt S, Weiss C, Diabaté S. 2008. In-vitro exposure systems and bioassays for the assessment of toxicity of nanoparticles to the human lung. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 3: 319–329.

[Pelka et al., 2009]

Pelka J, Gehrke h, Esselen M, Türk M, Crone M, Bräse S, Muller T, Blank H, Send W, Zibat V, Brenner P, Schneider R, Gerthsen D, Marko D. 2009. Cellular Uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity. Chem Res Tox 22: 649–659.

[Peters et al., 1998]

Peters A, Schulz H, Kreyling WG, Wichmann HE. 1998. Staub und Staubinhaltsstoffe/Feine und ultrafeine Partikel, in H.E. Wichmann, H.W. Schlipköter, G. Fülgraff (Hrsg.): „Handbuch der Umweltmedizin" VI-2, 14. Erg. Lfg. 10/98, ecomed-Verlag, Landsberg.

[Peterson und Mitchison, 2002]

Peterson JR, Mitchison TJ. 2002. Smal molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. Chem Biol 9: 1275–1285.

[Petrovi et al., 2007]

Petrovi D, Stojimirovi B, Petrovi B, Bugarci ZM, Bugarci ZD. 2007. Studies of interactions between platinum(ii) complexes and some biologically relevant molecules. Bioorg Med Chem 15(12): 4203–4211.

[Pflücker et al., 2001]

Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Gers-Barlag

- H. 2001. The human stratum corneum layer: An effective barrier against dermal uptake of different forms topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 92–97.
- [Phillips und Arlt, 2007]
Phillips DH, Arlt VM. 2007. The ^{32}P -postlabeling assay for DNA adducts. *Nat Protoc* 2: 2772–2781.
- [Poot et al., 1995]
Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ. 1995. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J Cell Physiol* 163: 555–560.
- [Porter et al., 2007]
Porter AE, Gass M, Muller K, Skepper JN, Midgley PA, Welland M. 2007. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nat Nanotechnol* 2: 713–717.
- [Pourazar et al., 2005]
Pourazar J, Mudway IS, Samet JM, Helleday R, Blomsberg A, Wilson SJ, Frew AJ, Kelly FJ, Sandström T. 2005. Diesel exhaust activates redox-sensitive transcription factors and kinases in human airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L724–L730.
- [Pulskamp, 2008]
Pulskamp K. 2008. Einfluss von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf die Zellphysiologie - mechanistische Studien zur toxischen Wirkung. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH).
- [Pulskamp et al., 2007]
Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF. 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett* 168(1): 58–74.
- [Raab et al., 2008]
Raab C, Simkó M, Fiedeler U, Nentwich M, Gázsó A. 2008. Herstellungsverfahren von Nanopartikeln und Nanomaterialien. *Nano Trust-Dossier* 6: 1–4.
- [Raffa et al., 2008]
Raffa V, Ciofani G, Nitodas S, Karachalios T, D'Alessandro D, Masini M, Cuschieri A. 2008. Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells?. *Carbon* 46: 1600–1610.
- [Raffa et al., 2010]
Raffa V, Ciofani G, Vittorio O, Riggio C, Cuschieri A. 2010. Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. *Nanomedicine* 5(1): 89–97.

[Ramirez und Saldanha, 2002]

Ramirez A, Saldanha PH. 2002. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 1(3): 246–260.

[Raynal et al., 2004]

Raynal J, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. 2004. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Mechanisms and comparison of ferumoxide and ferumoxtran-10. *Invest Radiol* 39: 56–63.

[Rechel, 2009]

Rechel A. 2009. Biologische Wirkung einwandiger Kohlenstoffnanoröhren auf humane Kolonkarzinomzellen. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).

[Reher und Rüdél, 2004]

Reher S, Rüdél H. 2004. Verbleib von platingruppenelementen in der umwelt, Technical report, Fraunhofer Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie.

[Rejman et al., 2004]

Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 377(1): 159–169.

[Ren et al., 2009]

Ren L, Kim HK, Zhong W. 2009. Capillary electrophoresis-assisted identification of peroxy radical generated by single-walled carbon nanotubes in a cell-free system. *Anal Chem* 81(13): 5510–5516.

[Renwick et al., 2001]

Renwick LC, Donaldson K, Clouter A. 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 172(2): 119–127.

[Rieder und Schmidt, 1987]

Rieder N, Schmidt K. 1987. Morphologische Arbeitsmethoden in der Biologie, Wiley-VCH Weinheim.

[Rodal et al., 1999]

Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 961–74.

[Rodriguez und Hrbek, 1999]

Rodriguez JA, Hrbek J. 1999. Interaction of sulfur with well-defined metal and oxide surfaces: Unraveling the mysteries behind catalyst poisoning and desulfurization. *Account of chemical Research* 32: 719–728.

[Rogers und Basu, 2005]

Rogers WJ, Basu P. 2005. Factors regulating macrophage endocytosis of nanoparticles: Implications for targeted magnetic resonance plaque imaging. *Atherosclerosis* 178: 67–73.

[Roller, 2008]

Roller M. 2008. Untersuchungen zur krebserzeugenden Wirkung von Nanopartikeln und anderen Stäuben. Bericht über das Forschungsprojekt F 2083; Herausgeber: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), ISBN: 978-3-88261-069-7, www.baua.de/nm_21712/de/Publikationen/Fachbeitraege/F2083,xv=vt.

[Römpp, 1997]

Römpp. 1997. Römpp - Lexikon der Chemie, Thieme Verlag Stuttgart - New York 10. Auflage.

[Ros-Baro et al., 2001]

Ros-Baro A, Lopez-Iglesias C, Peiro S, Bellido D, Palacin M, Zorzano A, Camps M. 2001. Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12050–12055.

[Roser et al., 1998]

Roser M, Fischer D, Kissel T. 1998. Surface-modified biodegradable albumin nanoand microspheres. ii: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 46(3): 255–263.

[Rota et al., 1999]

Rota C, Fann YC, Mason RP. 1999. Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J Biol Chem* 274(40): 28161–28168.

[Rothen-Rutishauser et al., 2007]

Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Gehr P. 2007. Interaction of particles with membranes. In: *Toxicology of Particles*, edited by Donaldson K, Borm P. Boca Raton, FL: CRC.

[Rubahn, 2004]

Rubahn HG. 2004. Nanophysik und Nanotechnologie, B. G. Teubner Verlag Wiesbaden 2. Auflage.

[Rufael et al., 2004]

Rufael T, Prasad J, Fischer D, Gland J. 1992. Hydrogenolysis of adsorbed methylthiolate on the pt(111) surface. *Surface Science* 278: 41–50.

[Saito et al., 1997]

Saito T, Zhang ZJ, Yamada T, Yamamoto T, Shibamori Y, Saito H. 1997. Similar pharma-

cokinetics and differential ototoxicity after administration with cisplatin and transplatin in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 117: 61–65.

[Salvetat-Delmotte und Rubio, 2002]

Salvetat-Delmotte JP, Rubio A. 2002. Mechanical properties of carbon nanotubes: a fiber digest for beginners. *Carbon* 40(10): 1729–1734.

[Satoh und Lindahl, 1994]

Satoh MS, Lindahl T. 1994. Enzymatic repair of oxidative DNA damage. *Cancer Res* 54: 1899–1901.

[Sayes et al., 2005]

Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL. 2005. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 26(36): 7587–7595.

[Sayes et al., 2006]

Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL. 2006. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicol Lett* 161(2): 135.

[Sayes et al., 2007]

Sayes CM, Reed KL, Warheit DB 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 97 (1): 163–80.

[Sayre et al., 2008]

Sayre LM, Perry G, Smith MA. 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21(1): 172–188.

[Schins und Hei, 2006]

Schins RPF, Hei TK. 2006. Genotoxic effects of particles. In: Donaldson K, Borm P, Boca R, editors. *Particle toxicology*. New York: CRC Press/Taylor & Francis Group 285–298.

[Schlegel et al., 1982]

Schlegel R, Dickson RB, Willingham MC, Pastan LH. 1982. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2291–2295.

[Schmid, 2004]

Schmid G. (Hg.) 2004. *Nanoparticles - From theory to application*. Wiley-VCH.

[Schmid et al., 2007]

Schmid M, Zimmermann S, Krug HF, Sures B. 2007. Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environ Int* 33: 385–390.

[Schrader, 2007]

Schrader C. 2007. Verfahrenstechnische Möglichkeiten zur Entfernung von organischen Spurenstoffen aus kommunalem Abwasser. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft Band 190. Oldenbourg Industrierlag GmbH 1. Auflage.

[Schrader, 1995]

Schrader B. 1995. Infrared and Raman Spectroscopy: methods and applications. VCH.

[Schulz et al., 1978]

Schulz GE, Schirmer RH, Sachsenheimer W, Pai EF. 1978 The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* 273: 120–124.

[Shall et al., 1996]

Shall ME, Edelstein AS, in A. S. Edelstein, R. C. Cammarata (Hrsg.). 1996. Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications, Institute of Physics Publishing, Bristol.

[Shaposhnikov et al., 2008]

Shaposhnikov SA, Salenko VB, Brunborg G, Nygren J, Collins AR. 2008. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis* 29(14): 3005–3012.

[Shivakumar et al., 1995]

Shivakumar CV, Brown DR, Deb S, Deb SP. 1995. Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Mol Cell Biol* 15: 6785–6793.

[Shukla et al., 2005]

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. 2005. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 21(23): 10644–10654.

[Shvedova et al., 2003]

Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman V, Maynard A, Baron P. 2003. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A* 24(66): 1909–1926.

[Shvedova et al., 2005]

Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P. 2005. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol-Lung C* 289(5): L698–L708.

[Sidaway et al., 2004]

Sidaway JE, Davidson RG, McTaggart F, Orton TC, Scott RC, Smith GJ, Brunskill NJ. 2004. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase reduce receptor-mediated endocytosis in opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 15: 2258–2265.

[Simkó et al., 2009]

Simkó M, Gazso A, Fiedeler U, Nentwich M. 2009. Nanopartikel, Freie Radikale und Oxidativer Stress. Nano Trust-Dossier 12: 1–4.

[Singh et al., 1988]

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184–191.

[Singh et al., 2006]

Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S. 2006. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* 3(10): 1865–1876.

[Sinnott et al., 1999]

Sinnott SB, Andrews R, Qian D, Rao AM, Mao Z, Dickey EC, Derbyshire F. 1999. Model of carbon nanotube growth through chemical vapor deposition. *Chem Phys Lett* 315(1-2): 25–30.

[Skehan et al., 1990]

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107–1112.

[Smart und Anderson, 2002]

Smart EJ, Anderson RG. 2002. Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol* 353: 131–139.

[Smart et al., 2006]

Smart DJ, Chipman JK, Hodges NJ. 2006. Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosin. *DNA Repair (Amest.)* 11: 1337–1345.

[Smart et al., 1994]

Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG. 1994. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* 127: 1185–1197.

[Smith et al., 1985]

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1): 76–85.

[Som et al., 2010]

Som C, Nowack B, Wick P, Krug H. 2010. Nanomaterialien in Textilien: Umwelt-, Gesundheits- und Sicherheits-Aspekte. EMPA Materials Science & Technology.

[Soto et al., 2005]

Soto KF, Carrasco A, Powell TG, Garza KM, Murr LE. 2005. Comparative in vitro

cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *J Nanopart Res* 7: 145–169.

[Sozer und Kokini, 2009]

Sozer N, Kokini JL. 2009. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends Biotechnol* 27(2): 81–89.

[Speit, 2002]

Speit G. 2002. Appropriate in vitro test conditions for genotoxicity testing of fibers. *Inhalation Toxicology* 14(1): 79–90.

[Speit, 2004]

Speit G, Schütz P, Bonzheim I, Trenz K, Hoffman H. 2004. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 146(2): 151–158.

[Stöger et al., 2007]

Stöger T, Schmid O, Takenada S, Schulz H. 2007. Inflammatory response to TiO₂ and carbonaceous particles scales best with BET surface area. *Environ Health Perspect* 115(6): A290–A291.

[Stone et al., 1998]

Stone V, Shaw J, Brown DM, MacNee W, Faux SP, Donaldson K. 1998. The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicology in Vitro* 12(6): 649–659.

[Sun et al., 2004]

Sun T, Jia Z, Xu Z. 2004. Different hydroxyl radical scavenging activity of water-soluble [beta]-alanine C60 adducts. *Bioorg Med Chem Lett* 14(7): 1779–1781.

[Sydlik et al., 2006]

Sydlik U, Bierhals K, Soufi M, Abel J, Schins RPF, Unfried K. 2006. Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: 725–733.

[Symons und Gutteridge, 1998] Symons MCR, Gutteridge JMC. 1998. Free radicals and iron: chemistry, biology, and medicine. Oxford Science Publications 1. Auflage.

[Takenaka et al., 2001]

Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J. 2001. Pulmonary and Systemic Distribution of Inhaled Ultrafine Silver Particles in Rats. *Environ Health Perspect* 109: 547–551.

[Tamaoki et al., 2004]

Tamaoki J, Isono K, Takeyama K, Tagaya E, Nakata J, Nagai A. 2004. Ultrafine carbon

black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF-R. *Am Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: 1127–1133.

[Tamura et al., 2004]

Tamura K, Takashi N, Akasaka T, Roska ID, Uo M, Totsuka Y, Watari F. 2004. Effects of micro/nano particle size on cell function and morphology. *Key Eng Mater* 254(6) :919–22.

[Tang et al., 2001]

Tang ZK, Zhang L, Wang N, Zhang XX, Wen GH, Li GD, Wang JN, Chan CT, Sheng P. 2001. Superconductivity in 4 angstrom single-walled carbon nanotubes. *Science* 292(5526): 2462–2465.

[Tian et al., 2006]

Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. 2006. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 20(7): 1202–1212.

[Tice et al., 2000]

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206–221.

[Tietze., 1969]

Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total an oxidized glutathion: Application to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502–522.

[Tobert, 2003]

Tobert JA. 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2: 517–526.

[Toyokuni und Akatsuka, 2007]

Toyokuni S, Akatsuka S. 2007. Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. *Pathol Int* 57: 461–473.

[Tran et al., 2002]

Tran HP, Prakash AS, Barnard R, Chiswell B, Ng JC. 2002. Arsenic inhibits the repair of DNA damage induced by benzo(a)pyrene. *Toxicol Lett* 133: 59–67.

[Unfried et al., 2007]

Unfried K, Albrecht C, Klotz LO, Mickecz A, Grether-Beck S, Schins RPF. 2007. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 1: 52–71.

[Urban, 1998]

Urban J. 1998. Crystallography of clusters. *Cryst Res Technol* 3: 1009–1024.

[Van Goethem et al., 1997]

Van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M. 1997. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res* 392(1-2): 31–43.

[Vilgelm et al., 2010]

Vilgelm AE, Washington MK, Wei J, Chen H, Prassolov VS, 6. Zaika AI,4.2010. Interactions of the p53 Protein Family in Cellular Stress Response in Gastrointestinal Tumors. *Mol Cancer Ther* 9: 693–705.

[Vivekchand et al., 2005]

Vivekchand SR, Jayakanth R, Govindaraj A, Rao CN. 2005. The problem of purifying single-walled carbon nanotubes. *Small* 1(10): 920–023.

[Voigt et al., 2006]

Voigt W, Dietrich A, Schmoll HJ. 2006. Overview of development status and clinical action. cisplatin and its analogues. *Pharm Unserer Zeit* 35(2): 134–143.

[Wang et al., 2008]

Wang G, Gong Y, Burczynski FJ, Hasinoff B. 2008. Cell lysis with dimethyl sulphoxide produces stable homogeneous solutions in the dichlorofluorescein oxidative stress assay. *Free Radic Res* 42(5): 435–441.

[Wang et al., 2006]

Wang F, Tan WB, Zhang Y, Fan X, Wang M. 2006. Luminescent nanomaterials for biological labelling. *Nanotechnology* 17(1): R1–R13.

[Wang et al., 2004]

Wang H, Wang J, Deng X, Sun H, Shi Z, Gu Z, Liu Y, Zhaoc Y. 2004. Biodistribution of Carbon Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice. *J Nanosci Nanotechnol* 4(8): 1019–1024.

[Wang und Zhang, 1997]

Wang CB, Zhang WX. 1997. Synthesizing Nanoscale Iron Particles for Rapid and Complete Dechlorination of TCE and PCBs. *Environ Sci Technol* 31: 2154–2156.

[Warheit und Frame, 2006]

Warheit DB, Frame SR 2006. Characterization and reclassification of titanium dioxide-related pulmonary lesions. *J. Occup. Environ Med* 48: 1308–1313.

[Warheit et al., 2004]

Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 77: 117–125.

[Warheit et al., 2007]

Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of Ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230: 90–104.

[Warnick et al., 2001]

Warnick CT, Dabbas B, Ford CD, Strait KA. 2001. Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 276: 27363–27370.

[Watanabe et al., 2009]

Watanabe A, Kajita M, Kim J, Kanayama A, Takahashi K, Mashino T, Miyamoto Y. 2009. In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles. *Nanotechnology* 20: 455105.

[Weber et al., 1999]

Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1: 20–26.

[Wei et al., 2001]

Wei BQ, Vajtai R, Ajayan PM. 2001. Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* 79(8): 1172–1174.

[Weichenthal et al., 2007]

Weichenthal S, Dufresne A, Infante-Rivard C. 2007. Indoor ultrafine particles and childhood asthma: exploring a potential public health concern. *Indoor Air* 17(2): 81–91.

[Whiteley und Murray, 2003]

Whiteley JD, Murray F. 2003. Anthropogenic platinum group element (pt, pd and rh) concentrations in road dusts and roadside soils from perth, western australia. *Sci Total Environ* 317(1-3): 121–135.

[Wick et al., 2007]

Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, Stark JW, Bruinink A. 2007. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett* 168(2): 121–131.

[Wiechelman et al., 1988]

Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175(1): 231–237.

[Wilson et al., 2002]

Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V. 2002. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 184(3): 172–179.

[Wirtschaftsministerium Hessen, 2010]

Broschüre NanoNormung des Hessischen Ministeriums für Wirtschaft, Verkehr und Landesentwicklung, http://nano-sicherheit.de/dynasite.cfm?dssid=337&dsmid=10903#-dstitle_74928 10.04.2010 16:58.

[Wojewódzka et al., 2002]

Wojewódzka M, Buraczewska I, Kruszewski M. 2002. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat Res* 2518(1): 9–20.

[Wong et al., 2006]

Wong YWH, Yuen CWM, Leung MYS, Ku SKA, Lam HLI. 2006. Selected applications of nanotechnology in textiles. *AUTEX Research Journal* 6(1).

[Wörle-Knirsch et al., 2006]

Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. 2006. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 6(6): 1261–1268.

[Wu et al., 2006]

Wu Y, Hudson J, Lu Q, Moore J, Mount A, Rao A, Alexov E, Ke PC. 2006. Coating single-walled carbon nanotubes with phospholipids. *J Phys Chem B* 110(6): 2475–2478.

[Xia et al., 2004]

Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A. 2004. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for Ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* 112: 1347–1358.

[Xia et al., 2006]

Xia T, Kovoichich M, Nel A. 2006. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in mediating particulate matter injury. *Clin Occup Environ Med* 5: 817–836.

[Xiong et al., 2007]

Xiong Y, Wiley B, Xia Y. 2007. Nanocrystals with unconventional shapes – a class of promising catalysts. *Angewandte Chemie Int Ed* 46: 7157–7159.

[Yamada et al., 1993]

Yamada H, Miyahara T, Kozuka H, Matsushashi T, Sasaki Y F. 1993. Potentiating effects

of organomercuries on clastogen-induced chromosome aberrations in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 290(2): 281–91.

[Yamago et al., 1995]

Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, Nakahara H, Enomoto S, Ambe F. 1995. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ^{14}C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem Biol* 2(6): 385–389.

[Yamakoshi et al., 2003]

Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T. 2003. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C_{60}) as potential medicines: $\text{O}_2^{\bullet-}$ versus $^1\text{O}_2$. *J Am Chem Soc* 125: 12803–12809.

[Yamashoji, 2008]

Yamashoji S. 2008. Characterization of extracellular menadion-catalyzed H_2O_2 production by NTH/3T3 cells. *IUBMB Life* 44(3): 555–563.

[Yang et al., 2009]

Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. 2009. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 29(1): 69–78.

[Yang et al., 2003]

Yang HY, Zhu SK, Pan N. 2003. Studying the Mechanisms of Titanium Dioxide as Ultraviolet-Blocking Additive for Films and Fabrics by an Improved Scheme. *J Appl Polym Sci Symp* 92: 3201–3210.

[Yao et al., 2002]

Yao D, Ehrlich M, Henis YI, Leof EB. 2002. Transforming growth factor β -receptor interact with AP2 by direct binding to $\beta 2$ subunit. *Mol Biol Cell* 13: 4001–4012.

[Yu et al., 1997]

Yu R, Tan TH, Kong ANT. 1997. Butylated Hydroxyanisole and its Metabolite tert-Butylhydroquinone Differentially Regulate Mitogen-activated Protein Kinases. *J Biol Chem* 272(46): 28962–28970.

[Zeller, 2004]

Zeller A. 2004. Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial von partikulären Platingrugenelementen in kultivierten Lungenzellen. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).

[Zereini et al., 2004]

Zereini F, Alt F, Messerschmidt J, von Bohlen A, Liebl K, Puttmann W. 2004. Concentration and distribution of platinum group elements (Pt, Pd, Rh) in airborne particulate matter in Frankfurt am Main, Germany. *Environ Sci Technol* 38: 1686–1692.

[Zereini et al., 2007]

Zereini F, Wiseman C, Puttmann W. 2007. Changes in palladium, platinum, and rhodium concentrations, and their spatial distribution in soils along a major highway in Germany from 1994 to 2004. *Environ Sci Technol* 41: 451–456.

[Zhan et al., 1999]

Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ. 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18: 2892–2900.

[Zhang, 2006]

Zhang DD. 2006. Mechanistic studies of the Nrf2 -Keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews* 38(4): 769–789.

[Zhang et al., 2004]

Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. 2004. Keap1 Is a Redox-Regulated Substrate Adaptor Protein for a Cul3-Dependent Ubiquitin Ligase Complex. *Molecular and Cellular Biology* 24(24): 10941–10953.

[Zhang und Erkey, 2006]

Zhang Y, Erkey C. 2006. Preparation of supported metallic nanoparticles using supercritical fluids: A review. *J Supercrit Fluids* 38: 252–267.

[Zhang et al., 1998]

Zhang Q, Kusaka Y, Sato K, Mo Y, Fukuda M, Donaldson K. 1998. Toxicity of ultrafine nickel particles in lungs after intratracheal instillation. *J Occup Health* 40: 171–176.

[Zhang et al., 2002]

Zhang Y, Kohler N, Zhang M. 2002. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* 23(7): 1553–1561.

[Zhang et al., 2003]

Zhang Q, Kusaka Y, Zhu X, Sato K, Mo Y, Kluz T, Donaldson K. 2003. Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. *J Occup Health* 45: 23–30.

[Zhang et al., 2010]

Zhang L, Laug L, Münchgesang W, Pippel E, Gösele U, Brandsch M, Knez M. 2010. Reducing Stress on Cells with Apoferritin-Encapsulated Platinum Nanoparticles. *Nano Lett* 10: 219–223.

[Zharkov et al., 2003]

Zharkov DO, Ishchenko AA, Douglas KT, Nevinsky GA. 2003. Recognition of damaged DNA by Escherichia coli FPG protein: Insights from structural and kinetic data. *Mutat Res* 531: 141–156.

[Zheng et al., 2003]

Zheng M, Jagota A, Semke ED, Diner BA, McLean RS, Lustig SR, Richardson RE, Tassi NG. 2003. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat Mater* 2(5): 338–342.

[Zhong et al., 2004]

Zhong CJ, Maye MM, Luo J, Kariuki N. 2004. Nanoparticles in catalysis, in „Nanoparticles: Building Clocks for Nanotechnology“. Kluwer Academics / Plenum Publishers New York.

[Zhou et al., 2001]

Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C. 2001. A role for p53 in base excision repair. *Embo J* 20: 914–923.

[Zhu et al., 2007]

Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y. 2007. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano Lett* 7(12): 3592–3597.

[Zhu et al., 2006]

Zhu Y, Zhao Q, Li Y, Cai X, Li W. 2006. The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylonychia mytilus*. *J Nanosci Nanotech* 6: 1357–1364.

[Zimmermann et al., 2002]

Zimmermann S, Alt F, Messerschmidt J, von Bohlen A, Taraschewski H, Sures B. 2002. Biological availability of traffic-related platinum-group elements (palladium, platinum, and rhodium) and other metals to the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in water containing road dust. *Environ Toxicol Chem* 21(12): 2713–2718.

Anhang A

Abstracts

A.1 Abstract Deutsch

Nanomaterialien wurden bislang vornehmlich als inhalatives Gesundheitsrisiko betrachtet. Die steigende Produktion und die rasante Entwicklung neuer Applikationsfelder werfen jedoch die Frage nach einer Gesundheitsgefährdung durch oral aufgenommene Nanomaterialien auf. Im Fokus dieser Arbeit stand daher die toxikologische Relevanz von einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (single walled carbon nanotube, SWCNT) und Platin Nanopartikeln (Pt-NP) für Zellen des Gastrointestinaltrakts (HT29-Zellen). Für SWCNTs und Pt-NP wurde bereits gezeigt, dass diese in Organismen der Nahrungskette bioverfügbar sind, was eine orale Aufnahme dieser Nanomaterialien nahelegt.

Es konnte gezeigt werden, dass SWCNTs in HT29 Zellen eine leichte zytotoxische Wirkung ausüben. Des Weiteren wurden eine schwache Zunahme des zellulären Glutathion (GSH)- und des nukleären Nrf2 ("nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2")-Gehalts festgestellt. Zudem wiesen weitere Untersuchungen auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) hin, was in Summe auf eine SWCNT-vermittelte Modulation des zellulären Redoxstatus hindeutet. Weiterhin wurde eine DNA-schädigende Wirkung beobachtet und diese durch eine erhöhte Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 bestätigt. Die DNA-strangbrechenden Eigenschaften der SWCNTs konnten nicht mit einer oxidativen Schädigung der DNA in Verbindung gebracht werden, was darauf hinweist, dass die genotoxische Wirkung nicht primär auf der Induktion von oxidativem Stress beruht. Die Exposition gegenüber SWCNTs führte weiterhin zu einer leichten Bildung von kinetochor-negativen Mikrokernen in V79 Zellen, womit das genotoxische Potenzial dieses Nanomaterials weiter untermauert wurde.

Pt-NP wurden in HT29 Zellen aufgenommen ohne die Viabilität dieser Zelllinie zu beeinträchtigen. Jedoch konnten eine Verminderung des zellulären GSH-Gehalts sowie eine Beeinflussung der DNA-Integrität beobachtet werden. Diese Effekte korrelierten invers mit dem Partikeldurchmesser und verstärkten sich mit steigender Inkubationsdauer, schienen aber nicht auf die Bildung von ROS zurückzuführen zu sein.

Zusammenfassend heben die vorhandenen Daten die toxikologische Relevanz nanostrukturierten Materials für Zellen des Gastrointestinaltrakts und die Notwendigkeit eingehender Untersuchungen bezüglich ihres gesundheitlichen Risikos hervor.

A.2 Abstract English

Nanomaterials are discussed predominantly as an inhalation hazard. However, the increasing production and the rapid development of novel fields of application raise questions on the health impact of nanomaterials taken up orally. Hence, the present study focused on the toxicological relevance of single walled carbon nanotubes (SWCNTs) and platinum nanoparticles (Pt-NP) in cells originating from the gastrointestinal tract (HT29 cells). SWCNTs and Pt-NP were reported to be bioavailable in organisms of the food chain, resulting in a potential oral uptake of these nanomaterials.

SWCNTs were found to mediate slight cytotoxic effects in HT29 cells. Moreover, a slight increase of the cellular glutathione (GSH)- and the nuclear Nrf2 (nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2)-level was observed, accompanied by an indication of the generation of reactive oxygen species (ROS), in sum indicating a SWCNT-induced modulation of the cellular redox status. Furthermore, DNA damaging effects were observed. This result was supported by an increased activation of the tumor suppressor protein p53. The increase of the DNA-strandbreaking properties of SWCNTs was not associated with oxidative DNA damages, indicating that the genotoxic effect is not primarily based on the onset of oxidative stress. Additionally, exposure to SWCNTs resulted in a slight induction of kinetochore-negative micronuclei in V79 cells, further affirming the genotoxic potential of this nanomaterial.

Pt-NP were taken up into HT29 cells, showing no impact on the viability of this cell line. Indeed, they were found to decrease the cellular GSH level and to impair DNA integrity. These effects correlated inversely with the particle size and were enhanced with increasing incubation time but appeared not to be based on the formation of ROS.

In summary, the available data highlights the toxicological relevance of nanostructured materials for cells of the gastrointestinal tract and the demand for scrutiny of their adverse health effects.

Anhang B

Formeln

Lineare Regression: $y = A + B \cdot x$ nach Origin 6.0/7.0 mit Messpunkten (x/y) :

y-Achsenabschnitt (A):

$$A = \frac{(\sum_i y_i)(\sum_i x_i^2) - (\sum_i x_i)(\sum_i (x_i \cdot y_i))}{N}$$

Steigung (B):

$$B = \frac{n \sum_i (x_i \cdot y_i) - (\sum_i x_i)(\sum_i y_i)}{N}$$

Nenner (N):

$$N = n \sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i \right)^2$$

Fehler der Steigung (m_B):

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnitts(m_A):

$$m_A = \sqrt{\frac{S \sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme (S):

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - Bx_i - A)^2$$

IC₅₀-Wert:

$$IC_{50} = \frac{50 - A}{B}$$

Fehler des IC₅₀-Werts (m_{IC50}):

$$m_{IC50} = \sqrt{\left(-\frac{1}{B}\right)^2 \cdot (m_A)^2 + \left(\frac{A - 50}{B^2}\right)^2 \cdot (m_B)^2}$$

Arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$):

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Standardabweichung (σ_{n-1}):

$$\sigma_{n-1} = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ausreißertest nach Nalimov (r):

$$r = \frac{|x^* - \bar{x}|}{\sigma_{n-1}} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Anhang C

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Joanna Magdalena Pelka
Wohnort:	Kurt-Tichy-Gasse 6/5/1 1100 Wien, Österreich
Geburtsdatum:	23.12.1980
Geburtsort:	Warschau
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	polnisch

Schulausbildung:

02/1988 – 12/1991	Grundschule Weidenberg
01/1991 – 08/1991	Grundschule Heuchling, Lauf a. d. Pegnitz
09/1991 – 08/1993	Bismarck-Schule, Nürnberg
09/1993 – 08/1997	Veit-Stoß-Realschule, Nürnberg
09/1997 – 08/2001	Johannes-Scharrer-Gymnasium, Nürnberg

Studium:

- 10/2001 – 10/2005 Studium der Lebensmittelchemie an der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Abschluss des ersten Staatsexamens für Lebensmittelchemiker
- 12/2005 – 11/2006 Praktisches Jahr am Bayerischen Landesamt für Gesundheit
und Lebensmittelsicherheit
Abschluss des zweiten Staatsexamens für
Lebensmittelchemiker
- 03/2007 – 06/2009 Promotionsarbeit im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. D.
Marko an der Universität Karlsruhe im Institut für
Angewandte Biowissenschaften, Abteilung
Lebensmitteltoxikologie
- 06/2009 – 11/2010 Fertigstellung der Promotion im Arbeitskreis von Frau Prof.
Dr. D. Marko an der Universität Wien im Institut für
Lebensmittelchemie und Toxikologie

Anhang D

Publikationsliste

D.1 Veröffentlichungen

- 2007 Muscat S, **Pelka J**, Hegele J, Weigle B, Munch G, Pischetsrieder M. 2007. Coffee and Maillard Products activate NF- κ B in macrophages via H₂O₂ production. Mol Nutr Food Chem 51(5): 525–535.
- 2009 **Pelka J**, Gehrke H, Esselen M, Marko D. 2009. Influence of platinum nanoparticles on oxidative stress and DNA integrity in human colon carcinoma cells. Chem Res Tox 22: 649–659.
- 2010 **Pelka J**, Gehrke H, Rechel A, Kappes FH, Hartinger CG, Marko D. 2010. DNA damaging properties of single walled carbon nanotubes in human colon carcinoma cells (eingereicht bei Nanotoxicology).
- Gehrke H, Frühmesser A, **Pelka J**, Esselen M, Hecht L, Marquardt C, Blank H, Schuchmann HP, Diabaté S, Weiss C, Gerthsen D, Marko D. 2010. In Vitro Toxicity of Silica Nanoparticles in Human Carcinoma Cells (in Bearbeitung).
- Gehrke H, **Pelka J**, Hartinger C, Marko D. 2010. DNA damaging properties of Pt nanoparticles (in Bearbeitung).

Blank H, Gehrke H, **Pelka J**, Schneider R, Weiss C, Marko D, Gerthsen D.
2010. Novel Electron Microscopic Techniques for the Detection of Small
Nanoparticles in Cells (in Bearbeitung).

D.2 Posterbeiträge

- 09/2007 **Pelka J**, Gehrke H, und Marko D. Zelluläre Wirkungen von Platinnanopartikeln in humanen Kolonkarzinomzellen.
36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Universität Nürnberg-Erlangen, Deutschland.
- 07/2008 **Pelka J**, Gehrke H, Marko D. Toxicological effects of metallic platinum-nanoparticles in human colon carcinoma cells.
BW ToxNet Meeting, Tübingen, Deutschland.
- 09/2008 Gehrke H, **Pelka J**, Marko D. Einfluss von Platinnanopartikeln auf den zellulären Redoxstatus von humanen Kolonkarzinomzellen.
37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, Deutschland.
- 03/2009 **Pelka J**, Rechel A, Marko D. Biological response to single walled carbon nanotubes in gastrointestinal cells.
3rd Symposium of the Graduate College: Nanoparticles and the Gastrointestinal Tract. Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Deutschland.
- 03/2009 **Pelka J**, Gehrke H, Marko D. Impact of metallic platinum nanoparticles on the cellular redox status of gastrointestinal cells.
51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie; Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz, Deutschland.
- 02/2010 **Pelka J**, Rechel A, Marko D. DNA strandbreaking properties of single walled carbon nanotubes in human colon carcinoma cells.
6. Wissenschaftliches Symposium der Österreichischen Gesellschaft für Toxikologie (ASTOX), Wien, Österreich.

- 06/2010 **Pelka J**, Rechel A, Marko D. DNA strandbreaking properties of single walled carbon nanotubes in human colon carcinoma cell.
Gehrke H, **Pelka J**, Hartinger C, Marko D. DNA-damaging properties of platinum nanoparticles.
3rd Nanotoxicology Conference, Edinburgh, Scotland.

Anhang E

Dank

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Fr. Prof. Dr. D. Marko für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis, für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Unterstützung und Motivation in manchen schwierigen Momenten.

Hr. Prof. Dr. S. Bräse für die Ermöglichung der Erstellung dieser Arbeit.

Fr. Prof. Dr. D. Gerthsen, Hr. Prof. Dr. S. Bräse, Hr. Prof. Dr.-Ing. M. Türk sowie allen weiteren Mitarbeitern des „Nano-Cell“-Projekts für die konstruktive und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Hr. Prof. Dr. M. Kappes und Hr. Dr. F. Hennrich für die Bereitstellung der Kohlenstoffnanoröhren sowie für die Charakterisierung des Testmaterials.

Hr. Dr. C. Hartinger für die Durchführung der ICP-MS-Messungen.

Meinen Korrekturleser/innen Helge Gehrke, Simone Bächler, Swantje Winkler und Dr. Markus Fehr.

Meinen Diplomanden Helge Gehrke und Anja Rechel für die nette und konstruktive Zusammenarbeit.

Allen ehemaligen und jetzigen Kollegen des AK Marko: Simone, Swantje, Markus, Helge, Volker, Matthias, Nadine, Nicole, Ute, Christoph, Christopher, Jessi, Melanie, Diana und Gudrun. Danke insbesondere für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie und Berno. DANKE!

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Wien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben.

Wien, den 18.10.2010