



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7401

# **Einfluss von Kohlenstoff- Nanopartikeln auf die Zellphysiologie – mechanistische Studien zur toxischen Wirkung**

**K. Pulskamp**

Institut für Toxikologie und Genetik

**Juni 2008**



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7401

Einfluss von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf die  
Zellphysiologie – mechanistische Studien zur  
toxischen Wirkung

**Karin Pulskamp**

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2008

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-074012

# **Einfluss von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf die Zellphysiologie – mechanistische Studien zur toxischen Wirkung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

**DISSERTATION**

von

**Karin Pulskamp**

aus Karlsruhe

2008

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse

Referent: Prof. Dr. H.F. Krug

Korreferent: Prof. Dr. H. Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2008



## Zusammenfassung

Neuen Technologien wird oftmals mit Argwohn und Vorurteilen sowie einem hohen Anspruch auf Sicherheit und regulatorischen Maßnahmen begegnet. Im Fall der Nanotechnologie müssen den viel versprechenden neuen Möglichkeiten die potentiellen Risiken einer Expositionsgefährdung am Arbeitsplatz oder der Umwelt bei der Bewertung gegenübergestellt werden. Ähnlich wie bei der Exposition gegenüber Ultrafeinstäuben, stellt sich mit zunehmender Produktion und Verarbeitung von Nanomaterialien die Frage nach einer möglichen Toxizität bzw. ihren Auswirkungen auf die Umwelt. Die toxikologische Charakterisierung beispielsweise von neuartigen Kohlenstoff-Nanomaterialien hat gerade erst begonnen, und die bisherigen Daten sind noch sehr lückenhaft und oftmals widersprüchlich.

Als wichtige Vertreter für Nanomaterialien wurden für die vorliegende Arbeit verschiedene Typen von einwandigen Kohlenstoff Nanoröhren (*single-walled Carbon Nanotubes*; SWCNTs) ausgewählt, die sich hauptsächlich in der Art und Menge ihrer synthese-bedingten Verunreinigungen, wie z.B. den Metallen und amorphem Kohlenstoff, unterscheiden. Einen der bedeutendsten Expositionswege stellt sicher die Inhalation und damit die Exposition der Lunge dar. Aus diesem Grund wurden humane Lungenepithelzellen (A549) sowie humane Endothel-ähnliche Zellen (ECV304) gewählt, um eine potentielle Toxizität, sowie deren zugrunde liegende Mechanismen dieser neuartigen Kohlenstoff-Nanoteilchen, im *in vitro* Zellsystem eingehend zu untersuchen und zu charakterisieren.

Mithilfe lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Methoden konnte zunächst eine intrazelluläre Aufnahme der SWCNTs dokumentiert werden, die sowohl frei als auch in membranumschlossenen Vesikeln vorlagen, was zu verändertem zellulären Verhalten führen könnte. Weiterhin konnte mithilfe standardisierter Vitalitätstests (WST-1, LDH-Test, PI-Färbung) keinerlei akut cytotoxische Wirkung der SWCNTs auf unterschiedliche Zelllinien festgestellt werden. Allerdings wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Kohlenstoff-Nanoröhren mit dem MTT-Test interagieren können und somit einen „falsch positiven“ Effekt, in Bezug auf ihre Cytotoxizität hervorrufen. Des Weiteren konnte weder eine apoptotische noch anti-proliferative Wirkung nach SWCNT-Kontakt der Zellen nachgewiesen werden. Eine Schlüsselrolle in der SWCNT-induzierten Toxizität scheint jedoch die Fähigkeit einzunehmen, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und somit

Oxidativen Stress auszulösen, wobei die Art und Menge der Verunreinigungen hierbei einen wesentlichen Faktor darstellen, der sowohl die Höhe als auch die zeitliche ROS-Freisetzung bestimmt. Auch bei der Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalwegen, wie dem NFκB-Signalweg scheint ROS eine zentrale Bedeutung zu haben, auch wenn Antworten beobachtet wurden, die außerhalb der ROS-vermittelten Reaktionswege liegen müssen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind richtungweisend in Bezug auf die potentielle Toxizität und das inflammatorische Potential der neuartigen Kohlenstoff-Nanomaterialien. Die Ergebnisse belegen, dass die hier verwendeten SWCNTs keinerlei akute Cytotoxizität *in vitro* aufweisen, jedoch erheblichen Einfluss auf die Analysesysteme selbst ausüben können. Auf der anderen Seite haben sie eine hohe Attraktivität für Zellen inne, die zu einer aktiven Umstrukturierung der Zellen und SWCNT-Zell-Agglomeraten führt.

Die vorliegenden Hinweise untermauern die Notwendigkeit, dass eine genaue Überprüfung, sowohl der Toxizität als auch der Biokompatibilität, mit standardisierten Materialien sowie unabhängigen Testsystemen, unerlässlich ist, um die Sicherheit der Materialien aber auch der gewonnenen Erkenntnisse zu gewährleisten, damit der Weg für potentiell neue Anwendungen der neuen Nanomaterialien nachhaltig gestaltet werden kann.

## Influence of carbon nanoparticles on cell physiology – mechanistic studies on the toxic effects

### **Abstract**

New technologies often have to face high suspicion and prejudice and at the same time they also have to fulfill a high demand for safety and regulation. For emerging nanomaterials new possibilities as well as the potential risks of an occupational and environmental exposure needs to be evaluated carefully. As for ultrafine particles, the potential and the growing use of nanoparticles and their mass production have raised several questions about their safety and environmental impact. Research on the toxicity of new carbon conformations have just begun and the data are still fragmentary and often contradictory.

In the present study different types of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) were used as a model nanoparticle, which mainly differ in the type and amount of synthesis-related impurities (amorphous carbon, metals). At the moment one of the most likely exposure-routes for SWCNTs is by inhalation. In the following work human lung epithelial cells (A549) as well as an endothelial-like cell line were used in order to measure and characterize potential toxicity and the underlying mechanisms of these new carbon nanoparticles.

First of all an intracellular uptake of SWCNTs, which were either found freely distributed or enclosed in membrane-bound vesicles, was clearly demonstrated by the use of light and electron microscopy and may induce adverse effects. Although, no acute cytotoxicity could be observed after SWCNT-incubation of different cell lines using several viability assays (WST-1, LDH, PI-staining), the present study could demonstrate that carbon nanotubes can interact with widely used viability assays (MTT) leading to “false positive” results regarding their cytotoxic potential. Additionally, neither an apoptotic nor anti-proliferative effect could be detected. A key role in the SWCNT-induced toxicity seems to be their ability to induce reactive oxygen species (ROS) and therefore leading to oxidative stress. The type and amount of impurities play an important role in the amount of ROS induction as well as the time-dependency of the SWCNT-induced ROS-release. ROS also seems to be an important element in the activation of pro-inflammatory signalling pathways, e.g. the NF $\kappa$ B pathway. However, it has been shown that there exist other

mechanisms besides ROS-mediated signalling in order to explain the inflammatory potential of SWCNTs.

The present results have highlighted the difficulties in dealing with this new carbon nanomaterial and give raise to their potential toxicity and inflammatory potential. The data show that these SWCNTs exhibit no acute cytotoxicity *in vitro* but rather pose some attractiveness to cells to get closely attached to SWCNT material and to actively form SWCNT-cell-agglomerates. The available data clearly indicate that further studies on the possible toxicity as well as the biocompatibility with well-characterized nanomaterials are needed and the validation of these effects with independent test-systems is a prerequisite to determine the safety of nanomaterials and to open up new ways for possible applications.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	3
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Partikel.....</b>	<b>4</b>
2.1.1	<i>Die Lunge - die erste Verteidigungslinie nach Partikelinhalation.....</i>	5
2.1.2	<i>Toxizitätspotential von Partikeln.....</i>	7
<b>2.2</b>	<b>Nanotechnologie – Vision und Realität.....</b>	<b>10</b>
2.2.1	<i>Kohlenstoff Nanoröhren.....</i>	13
<b>2.3</b>	<b>Das Immunsystem – Entzündungsmechanismen.....</b>	<b>17</b>
2.3.1	<i>Oxidativer Stress.....</i>	19
2.3.2	<i>Die Toll-like Rezeptoren und der NF<math>\kappa</math>B-Signalweg.....</i>	21
<b>2.4</b>	<b>Zelladhäsion – „Focal Adhesions“.....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Laborgeräte und Programmsoftware.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>30</b>
3.3.1	<i>Die A549 Epithel-Zelllinie.....</i>	31
3.3.2	<i>Die ECV304 Endothel-ähnliche-Zelllinie.....</i>	32
3.3.3	<i>Bestimmung der Zellzahl.....</i>	33
3.3.4	<i>Langzeitkonservierung von Zellen.....</i>	33
3.3.5	<i>Das Auftauen von Zellen.....</i>	34
<b>3.4</b>	<b>Verwendete Partikel – Präparation und Aufreinigung.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....</b>	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Vitalitätstests.....</b>	<b>39</b>
3.6.1	<i>MTT-Test.....</i>	39
3.6.2	<i>LDH-Test.....</i>	41
3.6.3	<i>WST-1-Test.....</i>	43
<b>3.7</b>	<b>Durchflusszytometrie.....</b>	<b>44</b>
3.7.1	<i>Unterscheidung und Quantifizierung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin V-FITC/Propidiumiodid Färbung.....</i>	44

3.7.2	Messung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ).....	46
<b>3.8</b>	<b>Messung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies (ROS/RNS).....</b>	<b>48</b>
3.8.1	DCF-Test.....	48
3.8.2	DHR123-Test.....	50
3.8.3	Bestimmung von ROS mit Dihydroethidium (DHE)-Färbung.....	51
<b>3.9</b>	<b>Zellproliferations-Messung mittels ELISA (BrdU).....</b>	<b>52</b>
<b>3.10</b>	<b>Proteinanalytik.....</b>	<b>53</b>
3.10.1	Proteinbestimmung.....	53
3.10.2	Herstellung von Ganzzellextrakten.....	54
3.10.3	Herstellung von Kernextraktionen.....	55
3.10.4	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	56
3.10.5	Das Blotting.....	58
3.10.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	58
<b>3.11</b>	<b>Immunfluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>60</b>
3.11.1	Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen.....	60
3.11.2	Anfärben des Aktin-Cytoskeletts mit Rhodamine Phalloidine.....	61
<b>3.12</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der Kohlenstoff Nanoröhren.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>Zell-Partikel-Interaktion und Aufnahme von Kohlenstoff Nanoröhren in die Zellen.....</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Akute Toxizität.....</b>	<b>69</b>
4.3.1	Einfluss von Kohlenstoff Nanoröhren auf die Zellvitalität.....	70
4.3.2	Kohlenstoff Nanoröhren interagieren mit dem MTT-Formazan im Vitalitätstest.....	74
4.3.3	Kohlenstoff Nanoröhren induzieren keine Apoptose in humanen Lungenepithelzellen.....	75
<b>4.4</b>	<b>Geringe Proliferationssteigerung von humanen Lungenepithelzellen nach Inkubation mit Kohlenstoff Nanoröhren.....</b>	<b>78</b>
<b>4.5</b>	<b>Oxidativer Stress.....</b>	<b>81</b>
4.5.1	Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Kohlenstoff Nanoröhren.....	81
4.5.2	Verzögerter „oxidative burst“ in gereinigten Kohlenstoff Nanoröhren.....	83

4.5.3	<i>Partikel-induzierte ROS-Induktion im zellfreien System durch Kohlenstoff Nanoröhren.....</i>	92
<b>4.6</b>	<b><i>Keine Änderung des Mitochondrialen Membranpotentials (<math>\Delta\psi_m</math>) in humanen Lungenepithelzellen (A549) nach Inkubation mit Kohlenstoff Nanoröhren.....</i></b>	<b>93</b>
<b>4.7</b>	<b><i>Einfluss von Kohlenstoff Nanoröhren auf inflammatorische Signalwege – der NF<math>\kappa</math>B Signalweg.....</i></b>	<b>97</b>
4.7.1	<i>Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF<math>\kappa</math>B nach Kohlenstoff Nanoröhren Exposition.....</i>	98
<b>4.8</b>	<b><i>Entstehung von CNT-Zell-Agglomeraten, Aktin Stressfasern und „Focal Adhesions“ in humanen Lungenepithelzellen nach Behandlung mit Kohlenstoff Nanoröhren.....</i></b>	<b>108</b>
4.8.1	<i>Aktivierung der „Focal Adhesion“ Signalkaskade durch Kohlenstoff Nanoröhren.....</i>	114
<b>5</b>	<b><i>Diskussion.....</i></b>	<b>118</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Charakterisierung von Kohlenstoff Nanoröhren in biologischen Systemen.....</i></b>	<b>121</b>
<b>5.2</b>	<b><i>Aufnahme von Kohlenstoff Nanoröhren in Lungenzellen.....</i></b>	<b>123</b>
<b>5.3</b>	<b><i>Akute Toxizität von Kohlenstoff Nanoröhren – toxisch oder nicht toxisch?!.....</i></b>	<b>128</b>
5.3.1	<i>Kohlenstoff Nanoröhren interagieren mit in vitro Testsystemen .....</i>	131
5.3.2	<i>Keine Apoptose Induktion durch Kohlenstoff Nanoröhren in humanen Lungenepithelzellen.....</i>	134
<b>5.4</b>	<b><i>Geringer Einfluss von Kohlenstoff Nanoröhren auf das Zellwachstumsverhalten.....</i></b>	<b>135</b>
<b>5.5</b>	<b><i>Oxidativer Stress – ein bedeutender Faktor in der Carbon Nanotube-induzierten Toxizität.....</i></b>	<b>136</b>
5.5.1	<i>CNT-Verunreinigungen als Auslöser des Oxidativen Stresses – indirekte CNT-Toxizität?.....</i>	138
5.5.2	<i>Die Freisetzung von ROS geht ohne Verlust des MMP einher – keine Beteiligung der Mitochondrien?.....</i>	143
<b>5.6</b>	<b><i>CNT-Wechselwirkungen mit inflammatorischen Signalwegen – die NF<math>\kappa</math>B-Aktivierung.....</i></b>	<b>144</b>

<b>5.7</b>	<b><i>Veränderungen im Adhäsionsverhalten und zelluläre morphologische Umgestaltung nach Nanotube-Inkubation - Kohlenstoff Nanoröhren als neuartiges Zellsubstrat?.....</i></b>	<b>150</b>
<b>5.8</b>	<b><i>Mechanismen der Kohlenstoff Nanoröhren-induzierten zellulären Antwort: eine Arbeitshypothese und Ausblick.....</i></b>	<b>155</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>194</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>197</b>

# 1 Einleitung

„Haben wir denn derart jeden Maßstab verloren, dass wir glauben, der Mensch müsse sich neuen Technologien anpassen, statt dass wir als Vorbedingung jeder neuen Technologie fordern, dass sie dem Menschen angepasst sein müsse?“ (Hans A. Pestalozzi).

Lange bevor die Technik in den Nanometerbereich vordringen konnte, waren Menschen bereits gegenüber kleinsten Partikeln exponiert. Noch vor Beginn der industriellen Revolution, die eine enorme Zunahme der anthropogenen Partikel, wie z.B. Rußpartikel, mit sich brachte, war der Mensch bereits mit einem Gemisch aus Fein- und Ultrafeinstäuben aus der Umwelt, durch z.B. Vulkanausbrüche, Sandstürme usw., belastet. Die Gesundheitsgefährdung durch Partikel ist schon lange bekannt und viel in der Literatur beschrieben (Dockery et al., 2005; Pope, III et al., 2002; Samet et al., 2000). Insbesondere bei arbeitsplatzbezogener Exposition treten auch entsprechende Erkrankungen auf, wie z.B. die Pneumokoniose bei Bergleuten im Kohleabbau (Heppleston, 1992). Epidemiologischen Studien zufolge ist eine Erhöhung des Schwebstaubes mit einem erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko verbunden, abhängig von Größe und Zusammensetzung der Staubpartikel (Schwartz et al., 2001; Thurston, 1996).

Die Nanotechnologie gilt als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts und löst damit die Mikrotechnologie des 20. Jahrhunderts, die vor allem die Informationstechnologie revolutioniert hat, ab. Die Hoffnungen und Erwartungen sind enorm. Es handelt sich hierbei nicht um eine spezifische Technologie, sondern um ein breites, sehr heterogenes Technologiefeld. Unter dem Begriff Nanotechnologie werden Materialien, Strukturen und Technologien zusammengefasst, deren verbindendes Element die Erzeugung oder das Vorhandensein von mindestens einer Größendimension kleiner als hundert Nanometer (nm) ist. Für die chemische Industrie zum Beispiel sind die Charakterisierung und gezielte Herstellung von Nanopartikeln, Mischungen aus Nanomaterialien mit klassischen Materialien durch Verknüpfung anorganischer Baueinheiten mit organischen Matrices, so genannte „Composites“, und die Erzeugung von nanostrukturierten Oberflächen, zurzeit die wichtigsten Anwendungsgebiete (<http://corporate.basf.com>). Die Nanotechnologie hat das Potential, vielen gesellschaftlichen Herausforderungen neue Perspektiven zu bieten. Vor allem im Bereich

der Biowissenschaften eröffnen sich neue Anwendungsmöglichkeiten in der Applikation von Arzneimitteln, in Diagnostik und Therapie sowie in der Produktion von Biomaterialien mit einer höheren Sensitivität und Spezifität.

Die Manipulation auf der Nano-Ebene führt zu Veränderungen der chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Materialien, wobei die chemische Zusammensetzung selbst dabei nicht verändert wird. Dieses können beispielsweise neue mechanische, optische, chemische, magnetische oder elektronische Eigenschaften sein. Ziel der Nanotechnologie ist es vor allem, aus diesen Nanoteilchen Materialien mit neuen Eigenschaften zu entwickeln. Die Attraktivität von Nanopartikeln für diese Zwecke basiert vor allem auf dem Verhältnis von Oberfläche zu Masse, was zu einer erhöhten katalytischen Reaktivität und Quantenphänomenen führt.

Neben den genannten Vorteilen und dem Fortschritt in Technik und Medizin, den die Nanotechnologie mit sich bringen kann, sind allerdings noch wenige gesicherte Untersuchungsergebnisse bezüglich des Gefahrenpotentials und einer möglichen Toxizität dieser kleinsten Partikel bekannt. Diese Unwissenheit kann, begleitend zu den bisher bekannten Ergebnissen, dazu führen, dass Spekulationen aufkommen, deren Grenzen bis hin in den Science Fiction Bereich, in dem Nanopartikel sich selbst replizieren und außer Kontrolle geraten, reichen. Dies macht es umso notwendiger, sicherheitsrelevante Forschung zu betreiben, eine fundierte Datenbasis zu schaffen, um die wirklichen Gefährdungen zu identifizieren.

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Kohlenstoff Nanoröhren repräsentieren eine neue Klasse von Nanomaterialien, die aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften ein viel versprechendes Potential für die industrielle Anwendung in verschiedenen Fachbereichen besitzen. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch die zellulären Wirkungsmechanismen der *Carbon Nanotubes* (CNTs) nicht genau aufgeklärt.

Um einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise der CNTs zu erhalten, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit im *in vitro* Zellsystem eine genaue Charakterisierung der zellulären und molekularen CNT-induzierten Mechanismen auf die Zellphysiologie und zelluläre Funktion sowie mögliche potentielle toxikologische Endpunkte durch verschiedene Vertreter der Kohlenstoff Nanoröhren durchgeführt werden. Als Modellsystem wurden menschliche Lungenepithel- und Endothel-ähnliche Zellen verwendet, die auf ihre zellulären Reaktionen nach CNT-Inkubation überprüft wurden. Im Mittelpunkt dieser Studie steht die Beeinflussung der CNTs auf die Zellvitalität und Integrität, sowie Entzündungsreaktionen, wie z.B. die Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Es werden sowohl mögliche Effekte auf inflammatorische Signalwege als auch Adhäsions- und Migrationsverhalten untersucht. Ein Schwerpunkt der Arbeit bildet dabei die Untersuchung des Einflusses von Partikeleigenschaften auf die zelluläre Antwort durch unterschiedliche Nanotube-Materialien, die sich in Art und Menge ihrer Verunreinigungen unterscheiden.

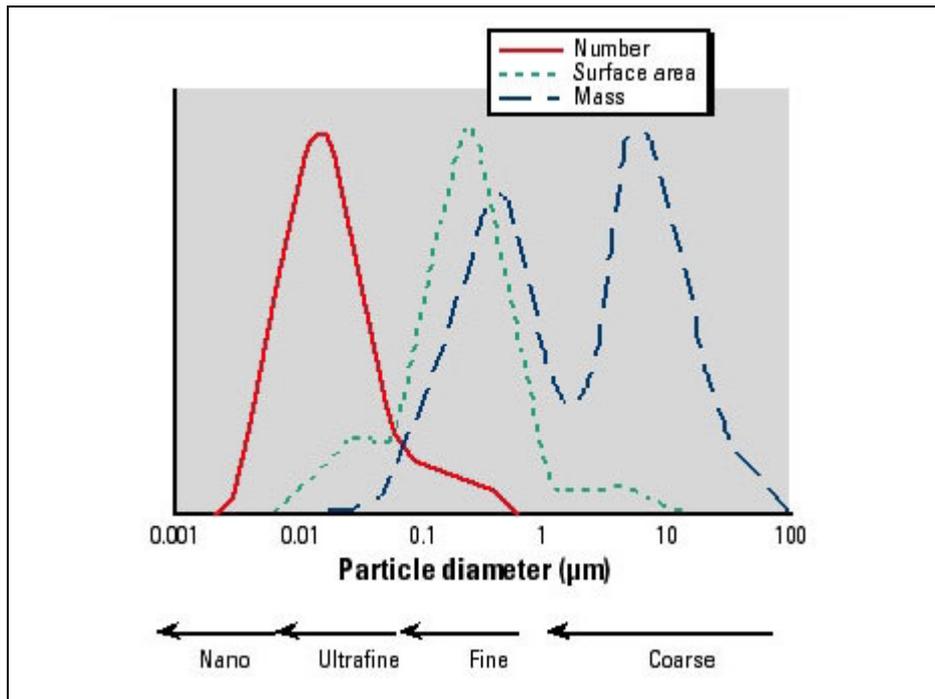
Aufgrund der geringen Größe und ihrer faserförmigen Struktur wird eine ähnliche Toxizität wie die der Ultrafeinstäube und synthetischen Fasern nach Inhalation erwartet. Die neuartigen Eigenschaften von Nanoteilchen lassen allerdings auch an und in der Zelle Reaktionen erwarten, die es bisher in dieser Form vielleicht noch nicht gab.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Partikel

In der Atmosphäre liegen Partikel, die man auch als Schwebstoffe bezeichnet, in einem Aerosol vor. Als Schwebstaub gelten alle festen und flüssigen Teilchen in der Außenluft. Zu den natürlich vorkommenden Partikeln gehören als Flüssigkeitspartikel die Wassertröpfchen in Nebel und Wolken, als feste Partikel die Mineralteilchen und Rußpartikel sowie Stäube von Bodenerosionen, die organisch biologischen Partikel (Pollen, Sporen) und schließlich noch die anthropogenen Partikel. Diese oft als Abfall- bzw. Nebenprodukt entstehenden Partikel entstammen meist aus Verbrennungsanlagen zur Energieversorgung, Abfallbeseitigung, Industrieprozessen sowie aus dem Straßenverkehr. Die vorgeschlagene und meist angewandte Ordnung für Partikel richtet sich nach der Größe. Sie werden in PM („*particulate matter*“) unterteilt und mit verschiedenen Größenangaben versehen. Die gängige Einteilung ist: PM<sub>10</sub> (Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser  $\leq 10 \mu\text{m}$ ), PM<sub>2,5</sub> (Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser  $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ) und die ultrafeine Fraktion PM<sub>0,1</sub> (Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser  $\leq 0,1 \mu\text{m}$ ).

Die jährlichen Staubemissionen in Deutschland betragen vor etwa 40 Jahren noch weit mehr als drei Millionen (Mio.) Tonnen (t) jährlich. Bis 1990 gingen die Staubemissionen insbesondere Dank der Staubabscheidung in den Großanlagen der Kraftwerke und der Industrie sowie durch Brennstoffumstellung von ca. 1,4 Mio. t/Jahr um ca. eine Millionen Tonnen auf 0,4 Mio. t/Jahr zurück. Die PM<sub>10</sub> Jahresmittelwerte liegen in Deutschland meist zwischen 20 und 35  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  und damit unterhalb des EU-Grenzwertes von 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (<http://www.umweltbundesamt.de>). Der Grenzwert für PM<sub>2,5</sub> ist derzeit durch die amerikanische Umweltbehörde (Environmental Protection Agency, EPA) auf 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  festgelegt. Diese Richtwerte berücksichtigen allerdings nur die Massenkonzentration des Gesamtstaubes ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) und nicht die Partikelanzahlkonzentrationen ( $\text{N}/\text{m}^3$ ) der einzelnen Größenfraktionen. Trotz dieses Rückganges der Gesamtbelastung durch Stäube (auf die Masse bezogen) nahm jedoch die Partikelanzahl insbesondere durch eine Zunahme der Feinstaubfraktion zu (Wichmann et al., 2000). Gerade die kleinsten Partikel aber zeichnen sich durch eine erheblich größere Oberfläche im Verhältnis zum Volumen und der Masse aus (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1: Typische Größenverteilung von urbanen Partikeln**  
(Quelle: Oberdörster and Utell, 2002)

### **2.1.1 Die Lunge – die erste Verteidigungslinie nach Partikelinhalation**

Der oxidative Zellstoffwechsel erfordert einen permanenten Gasaustausch zwischen Organismus und Umgebung. Die Lunge ist dabei das zentrale Organ für die Luftatmung. Phylogenetisch entstand sie bei Wirbeltieren aus einer Einstülpung der Körperwand mit einem fein verzweigten System von Atmungswegen, bestehend aus den Bronchien und Bronchiolen sowie den Alveolen, in denen der eigentliche Gasaustausch stattfindet. Die luftführenden Bronchien sind mit einem mehrreihigen Flimmerepithel ausgekleidet, während zu den Alveolen hin ein einschichtiges Epithel überwiegt. Beim Menschen beträgt die respiratorische Oberfläche ca.  $140 \text{ m}^2$ , die täglich mit bis zu  $15\text{-}20 \text{ m}^3$  Luft in Kontakt kommt. Dies bedingt einen ständigen Kontakt mit apathogenen und fakultativ pathogenen Keimen sowie Partikelaerosolen. Luftgetragene Keime bzw. Partikel kommen durch die Inhalation zunächst mit den Epithelzellen der Bronchien in Kontakt, welche die erste physikalische Abwehrbarriere darstellen.

Im Atmungssystem sorgen mehrere Schutzmechanismen dafür, dass eingeatmete Krankheitserreger und Fremdstoffe keinen Schaden anrichten können. Neben der mechanistischen Ausschleusung (Husten, Niesen) spielen die unspezifische und

spezifische Immunabwehr eine wichtige Rolle. Zur Bekämpfung von Bakterien und Viren oder zur Beseitigung nicht-infektiöser Partikel wird lokal eine Entzündungsreaktion durch die vor Ort anwesenden Immunzellen ausgelöst. Dabei werden neben reaktiven Sauerstoffspezies auch Proteine und Lipide freigesetzt, die als chemische Botenstoffe (Mediatoren) auf andere Zelltypen wirken, z.B. auf die Epithelzellen, welche die Lungenbläschen auskleiden, oder die Endothelzellen, welche die in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden Blutgefäße auskleiden (Abb. 2.2). Die einsetzende Bekämpfung der eingedrungenen Fremdkörper kann auch gesundes Gewebe in Mitleidenschaft ziehen, das durch anti-inflammatorische Prozesse wieder repariert werden muss.

### **Epithelzellen**

Epithelien sind Grenzflächen, die alle inneren und äußeren Körperflächen von mehrzelligen Organismen bedecken. Dazu gehören vor allem die Haut, der Gastrointestinaltrakt und der Respirationstrakt. Epithelzellen gelten als einfache Immunzellen, da ihnen zwei Schutzfunktionen zugeschrieben werden: eine physikalische, mechanische Barrierefunktion und eine Funktion als chemische Barriere, um den Eintritt von Keimen zu verhindern. Bestandteil der physikalischen Barriere sind die Zell-Zellverbindungen („tight junctions“), welche benachbarte Epithelzellen so abdichten, dass keine gelösten Stoffe zwischen dem Luftraum der Lunge und dem Körpergewebe per Diffusion übertreten können. Neben der Keimabwehr und dem mukoziliären Reinigungsmechanismen sind Epithelzellen des Respirationstraktes in der Lage, antimikrobielle Substanzen und Entzündungsmediatoren (chemische Barriere) zu sezernieren. Dazu gehören Lysozym, Lactoferrin, sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub>, ebenso wie Surfactant Proteine (SP-A und SP-D) und antimikrobielle Peptide. Auf Stimulation hin sind Epithelzellen ebenso in der Lage, Entzündungsmediatoren zu sezernieren (Martin and Frevert, 2005). Dazu gehören vor allem Chemokine und pro-inflammatorische Cytokine.

### **Endothelzellen**

Das Endothel bildet bei Vertebraten die innerste Zellschicht. Eine wichtige Funktion kommt den Endothelzellen in der Entstehung der Blutgefäße im Embryonalstadium zu. Während dieses Stadiums entwickeln sich die verschiedenen Gefäßtypen aus einer gemeinsamen Vorstufe, die lediglich aus Endothel und Basallamina besteht. In späteren

Entwicklungsstadien kontrollieren die Endothelzellen die Bildung des angrenzenden Bindegewebes und der glatten Muskulatur (Campbell and Campbell, 1986). Aufgrund ihrer exponierten Lage sind Endothelzellen mit Ausnahme der Blutzellen der einzige Zelltyp, der in direktem Kontakt zu Blut- und Lymphflüssigkeit steht. Je nach Lage im Körper kommen Endothelzellen entsprechend der vielfältigen Anforderungen in vielen verschiedenen Formen vor. Sie bilden in den Geweben, in denen eine genaue Kontrolle des Stoffaustausches erforderlich ist, eine dicke Zellschicht aus (z.B. Blut-Hirn-Schranke, Blut-Lunge-Schranke). Als Barriere zwischen dem strömenden Blut und der Gefäßwand übt das Endothel viele verschiedene Funktionen aus. Beispiele sind die Kontrolle des Stoffaustausches zwischen intra- und extravasalem Raum, die Homöostase, sowie die Beteiligung an immunologischen Prozessen, wie akuten und chronischen Entzündungsreaktionen (Wu and Thiagarajan, 1996).

### **2.1.2 Toxizitätspotential von Partikeln**

Das Gefahrenpotential der Partikel liegt vor allem in der geringen Größe. Je kleiner die Schwebstaubteilchen einer bestimmten definierten Menge sind, desto höher ist ihre Anzahlkonzentration und damit ihre Gesamtoberfläche und desto mehr können auch Umweltschadstoffe angelagert werden. Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser  $\leq 2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) können bis tief in die Lunge gelangen und dort direkt mit Zellen interagieren (Colvin, 2003; Donaldson et al., 2001; Oberdörster et al., 2005; Service, 2004) (Abb. 2.2). Sind diese Partikel erst einmal in der Lunge bzw. in den Alveolen, können sie Entzündungsmechanismen auslösen (Diabaté et al., 2002), sowie eine Schwächung der Phagozytose hervorrufen (Renwick et al., 2001) oder sogar zum Zelltod führen. In zahlreichen epidemiologischen Studien lassen sich quantitative Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen ableiten und es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Partikelkonzentration und einer erhöhten Inzidenz (Anzahl von Neuerkrankungen an einer bestimmten Krankheit innerhalb einer bestimmten Zeitspanne) von Erkrankungen der Atemwege (Asthma, Bronchitis), Herz-Kreislaufkrankungen, sowie einer erhöhten Mortalität (Dockery et al., 2005; Pope, III et al., 2002; Samet et al., 2000; Schwartz et al., 2001; Thurston, 1996). Die Studien zeigen, dass ein Anstieg der  $\text{PM}_{10}$ -Konzentration um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  mit einem Anstieg des Mortalitätsrisikos um 1% einhergeht. Diese Effekte wurden besonders in anfälligen, sehr jungen sowie alten Menschen und in solchen mit

bestehenden Lungen- und Herz-Kreislaufkrankungen beobachtet (Ibald-Mulli et al., 2002; Samet et al., 2000; Wichmann et al., 2000).

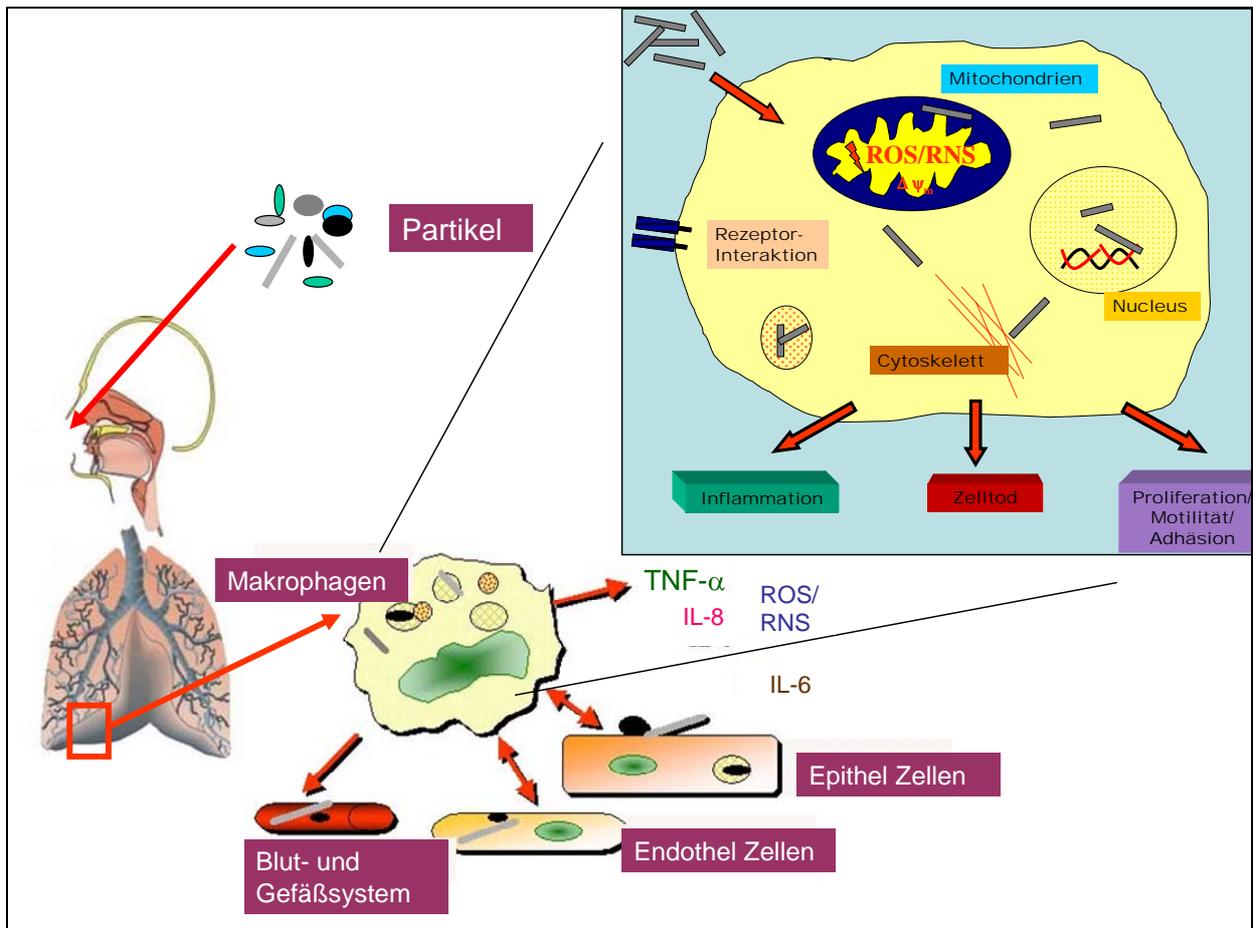
Mit Zunahme an industrieller Weiterentwicklung und gesellschaftlichem Wohlstand kam es zu einer Verschiebung der Partikelexposition von der hauptsächlich arbeitsplatzbezogenen bis hin zur alltäglichen Exposition der weltweiten Bevölkerung infolge von Umweltbelastungen durch luftgetragene Partikelmasse (PM). Diese Entwicklung könnte mit Entdeckung der Nanotechnologie und der damit verbundenen erhöhten potentiellen Exposition von industriell hergestellten Partikeln vermutlich noch weiter zunehmen.

Schwebstaubteilchen können als Fremdkörper dort, wo sie abgelagert werden, eine Reizwirkung ausüben, die zu entzündlichen Veränderungen führt. Je kleiner die Partikel sind, desto weiter können sie in die Atemwege vordringen. Partikel über 10  $\mu\text{m}$  Teilchengröße kommen kaum weiter als bis zu den Verzweigungen der Bronchien und Bronchiolen wo sie schließlich sedimentieren und durch das Flimmerepithel in die oberen Atemwege transportiert werden. Für diejenigen unter 2,5  $\mu\text{m}$  ist es jedoch möglich, bis zu den Alveolen vorzudringen und insbesondere Partikel unter 0,1  $\mu\text{m}$  können sogar über die Lungenbläschen in die Blutbahn vordringen und sich über das Gefäßsystem im Organismus verteilen. Im Bereich der Lungenbläschen sind Atmung und Blutkreislauf funktionell und anatomisch (Zelldicke  $\sim 0,5 \mu\text{m}$ ) eng miteinander verbunden. Deshalb können Störungen des einen Systems, z.B. des Atemtrakts, auch systemische Veränderungen im Herz-Kreislauf-System bewirken (Nemmar et al., 2004) (Abb. 2.2).

PM besteht aus einer Reihe von verschiedenen Komponenten, von denen einige mit den auftretenden gesundheitlichen Veränderungen in Verbindung gebracht wurden (Murr et al., 2004). Hierzu zählen die Ultrafeinen Partikel (Donaldson and Stone, 2003; Oberdörster, 1996; Wichmann et al., 2000), Endotoxine (Ning et al., 2000), und die Metalle (Gilmour et al., 1996).

Die inflammatorische Antwort nach Inhalation von Partikeln wurde eingehend untersucht und beschrieben (Borm, 2002; Castranova et al., 2001; Donaldson and Stone, 2003; Driscoll et al., 1996; Jorna et al., 1994; Mossman and Churg, 1998; Oberdörster, 1996; Riediker et al., 2004). Dabei zeigt sich u.a., dass die mit der Einwanderung von Entzündungszellen verbundene Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und

lysosomalen Enzymen das Lungenepithel so schädigt, dass die Fähigkeit zur Abwehr von Krankheitserregern beeinträchtigt wird und es zur Fibrose und Tumorgenese kommen kann. Für die Interpretation der Wirkung inhalierter Partikel müssen verschiedene Parameter berücksichtigt werden: Dosis, Deposition, Dimension, Beständigkeit und Abwehrreaktionen (Borm, 2002; Kreyling et al., 2004) (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Lokale und systemische Effekte nach Partikelexposition**

Ein Hauptaufnahmeweg nach Partikelexposition ist die Inhalation, wodurch Partikel je nach Größe bis tief in die Lunge vordringen können. Hier kommen sie in Kontakt mit verschiedenen Zellen des Immunsystems sowie Epithel- und Endothelzellen, und können sogar in das Blut- und Gefäßsystem translozieren. Der Kontakt mit Partikeln kann auf zellulärer Ebene zu verschiedenen Effekten führen: Entzündungsmechanismen, Proliferations-, Motilitäts-, Adhäsionsveränderungen und Zelltod. Die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Cytokinen und Chemokinen sowie ROS kann schließlich auch systemische Effekte im Organismus auslösen.

## 2.2 Nanotechnologie – Vision und Realität

Die Nanotechnologie ist der Sammelbegriff für völlig neue, innovative Technologiebereiche, welche u.a. Teilchen in Nanometergröße ( $10^{-9}$  m) produziert und verwendet. Diese neue Technologie befasst sich im Allgemeinen mit der definierten Erzeugung oder Verwendung von Nanostrukturen mit speziellen, neuen oder erweiterten physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften von vorhandenen Materialien, die erst im Nanometerbereich entstehen. Diese neue Technik soll eine Entwicklung und Verbesserung für unser Leben auf so unterschiedlichen Gebieten, wie dem der Informationstechnologie, Elektrotechnik und Maschinenbau sowie Diagnostik bringen (Masciangioli and Zhang, 2003).

Aber „nano“ ist nicht neu. Angefangen mit Bakterien, die das Erdmagnetfeld mithilfe von Nanomagneten wahrnehmen, bis hin zu den Bausteinen des Lebens; Nanopartikel spielen in der Natur schon sehr lange eine zentrale Rolle (Matsunaga and Sakaguchi, 2000). Die Größe von Atomen beträgt 0,15 bis 0,5 nm, die von Molekülen etwa einige Nanometer und die von Makromolekülen einige 10 nm. Viele auf Nanodimensionen beruhende Effekte werden schon lange genutzt, wie z.B. Nanogold als Farbpigment in Kirchenfenstern.

Im Allgemeinen kann man zwischen drei Typen nano-skaliger Partikel unterscheiden: die natürlich vorkommenden Partikel, solche, die als Abfall- bzw. Nebenprodukt z.B. bei Verbrennungsprozessen anthropogen entstehen (Evelyn et al., 2003), und die industriell synthetisierten Nanoteilchen. Industriell hergestellte Nanopartikel können nochmals in zwei Gruppen in Abhängigkeit ihrer Entstehung unterschieden werden: „*top down*“ oder „*bottom up*“, je nachdem, ob das Nanomaterial durch Verkleinerung eines großen Ganzen oder durch Zusammenfügen kleinerer Bausteine bis zum gewünschten Nanomaterial entsteht (Royal Society and the Royal Academy of Engineering, 2004).

Daraus resultieren wiederum viele verschiedene Definitionen für die Nanotechnologie: die Europäische Akademie Bad Neuenahr-Ahrweiler definiert in einer Studie: „Nanotechnologie basiert auf den fortschreitenden Anwendungen der Nanowissenschaften. Die Nanowissenschaften befassen sich mit funktionalen Systemen, die auf der Nutzung von Bausteinen mit spezifischen, größenabhängigen Eigenschaften der individuellen Bausteine oder eines Systems aus diesen basieren“ (Schmid et al., 2003). Die Definitionen des National Science and Technology Council (NSTC) ebenso wie die des U.S. National Nanotechnology Initiative (NNI) beschreiben hingegen spezifisch die

Forschung, Manipulation und Anwendung von Teilchen, die in mindestens einer Dimensionen kleiner als 100 nm sind. (NSTC Juni 2000, [http://www.becon.nih.gov/nstc\\_def\\_nano.htm](http://www.becon.nih.gov/nstc_def_nano.htm), <http://www.nano.gov/html/facts/whatIsNano.html>).

Die Attraktivität von Nanopartikeln basiert vor allem auf dem Verhältnis von Oberfläche zu Masse, das weit größer ist als das anderer Partikel im Mikrometer Bereich. Diese großen Oberflächen erlauben nicht nur die katalytische Beschleunigung von Reaktionen, sondern auch die Adsorption und den Transport anderer Verbindungen. Die Reaktionsfähigkeit der Oberfläche geht auf Quantenphänomene zurück und kann zu überraschendem Verhalten der Nanopartikel führen.

Neben den vielen Anwendungsgebieten in der Automobilindustrie, dem Maschinenbau und der Elektronik, sind auch Bereiche der Biologie, Pharmazie und Umwelttechnik durch Entwicklungen der Nanotechnologie betroffen und „Nano-Produkte“ haben Einzug in unser alltägliches Leben gefunden.

Beispiele für industrielle Anwendungen sind z.B. Lacke mit extrem hoher Kratzfestigkeit und Selbstreinigungseffekten (Lotus-Effekt), hoch fließfähige, thermoplastisch verarbeitbare Werkstoffe, Druckfarben mit langer Lebensdauer, hochleistungsfähige Energiespeicher, UV-Absorber mit hohem Lichtschutzfaktor für Sonnenschutzmittel und Textilfasern (Kaida et al., 2004). Silber-Nanoteilchen besitzen eine antimikrobielle Wirkung, die z.B. in Wand- und Fassadenfarben gegen Schimmelpilze eingesetzt werden kann (Kim et al., 2007).

Ein wichtiges Gebiet der Anwendung von Nanopartikeln umfasst außerdem neuartige Techniken der Medikamentenentwicklung, die zu geringeren Entwicklungskosten, kürzeren Produktionsphasen und geringerem Risiko führen sollen. Beispiel hierfür sind die nanoskaligen Polymer-Medikamenten-Konjugate, die als Transportvehikel studiert werden, wobei wasserlösliche Polymere (PGA, PEG, Dextran) genutzt werden, Medikamente in Bereiche zu tragen, in die sie auf andere Weise niemals vordringen könnten, wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke (Kreuter et al., 2002; Oberdörster, 2004; Otsuka et al., 2003; Tosi et al., 2007). Die Verwendung von magnetischen Nanopartikeln, die mittels Hyperthermie gezielt Krebszellen zerstören (Jordan et al., 2006), sowie der Einsatz der Nanotechnologie, zerstörtes Nervengewebe zu regenerieren und zu schützen (Silva, 2005), chemische- und biologische Zellanalytik (Pellegrino et al., 2005; Pellegrino et al., 2003) sind weitere Möglichkeiten für die vielseitigen und viel versprechenden Anwendungen in der Biomedizin.

Theoretisch können Nanopartikel aus jedem Material und allen chemischen Elementen hergestellt werden. Die meisten Nanomaterialien, die heute im Gebrauch sind, verwenden als Grundbausteine ihrer Synthese jedoch hauptsächlich Übergangsmetalle, Silizium, Kohlenstoff sowie Metalloxide. Die US Environmental Protection Agency (EPA) kategorisiert Nanopartikel in folgende Bereiche: Kohlenstoff basierend (Fullerene, Kohlenstoff Nanoröhren), Metalle (inklusive Quantum Dots), Dendrimere, „Composites“.

Das toxikologische Potential von Feinstäuben und insbesondere der Ultrafeinstäube ist bekannt und könnte Hinweise auf eine ähnliche Toxizität der industriellen Nanopartikel geben. Ultrafeinpartikel sind allerdings chemisch sehr heterogene Gemische, die hauptsächlich als Aerosol vorkommen und die mit Ausnahme der physikalischen Größe kaum Ähnlichkeit mit den meisten industriellen Nanopartikeln besitzen. Allerdings gibt es für industrielle Nanopartikel aufgrund ihrer vielseitigen Verwendbarkeit in Kosmetikartikeln und medizinischen Anwendungen auch dementsprechend viele verschiedene Expositionswege, was eine genaue Charakterisierung ihres Verhaltens in der Umwelt und im Organismus erschwert (Krug and Diabaté, 2003; Oberdörster and Utell, 2002).

Über das mögliche Gefährdungspotential oder die Toxizität dieser kleinsten Partikel ist jedoch nur wenig bekannt. Eine stetig anwachsende Zahl von Studien belegt allerdings die schädigenden Effekte der Nanopartikel im Tierversuch (Baggs et al., 1997; Chen et al., 2006; Oberdörster, 2004; Renwick et al., 2004) und *in vitro* (Adelmann et al., 1994; Brown et al., 2001; Stone et al., 2000). Beim Übergang zu Größenordnungen im Nanometerbereich können sich ursprüngliche Stoffeigenschaften erheblich verändern. Dies ist besonders für ihre industrielle Anwendung sehr nützlich, kann aber auch veränderte biologische Wirkungen mit sich bringen. Ein potentiell Risiko bietet auch die aufgrund ihrer geringen Größe stark vergrößerte Oberfläche, die eine erhöhte katalytische und biologische Aktivität hervorruft. Vor diesem Hintergrund besteht neben materialwissenschaftlichem auch toxikologischer Forschungsbedarf. Die Frage stellt sich daher: Geht mit Produkten auf Basis von Nanopartikeln eine nachweisbare Exposition für den Menschen bei Herstellung, Gebrauch oder Entsorgung einher, auf welchem Wege erfolgt diese Exposition, welche spezifischen Grenzwerte sollen festgelegt werden und wo verbleiben letztlich die Partikel, werden sie unverändert ausgeschieden oder verbleiben sie im Organismus?

### 2.2.1 Kohlenstoff Nanoröhren

Kohlenstoff ist eines der am häufigsten vorkommenden Elemente in der Natur. Seine hohe Variabilität führt zu vielen verschiedenen Formen, die im alltäglichen Leben vorkommen, z.B. als Graphit, Diamant, Kohlenwasserstoff, Ruß, Rohöl in komplexen Molekülen, etc. Mit der Entwicklung der Nanotechnologie sind allerdings noch weitere Formen von Kohlenstoff entdeckt worden. Dazu gehören die Anfang der 90er Jahre entdeckten Fullerene (C<sub>60</sub>) (Kroto, 2001) sowie die Kohlenstoff Nanoröhren.

Kohlenstoff Nanoröhren (*Carbon Nanotubes*, CNTs) repräsentieren auf dem Gebiet der Nanotechnologie eine neue Form von Kohlenstoff mit einzigartigen Eigenschaften. Im Jahre 1991 entdeckte Dr. Sumio Iijima der NEC Corp., einer japanischen Elektronik Firma, diese winzigen Röhren, die alle besonderen Eigenschaften der Nanopartikel in sich vereinen (Ajayan, 1999; Ajayan et al., 1999; Iijima et al., 1992). Strukturell gleichen Nanotubes aufgerollten Lagen aus Graphit, aufgebaut aus konzentrischen Zylindern, einwandig (*single-walled* CNTs, SWCNTs) oder mehrwandig (*multi-walled* CNTs, MWCNTs), wobei gewöhnlich das Ende der Röhre geschlossen ist (Abb. 2.3 (A)). Ihre Oberfläche zeichnet sich durch eine regelmäßige Anordnung von hexagonalen Kohlenstoff Molekülen aus. Individuell können SWCNTs einen Durchmesser von ~0,4 bis > 3 nm und MWCNTs einen Durchmesser von ~10 bis mindestens 50 nm bilden und mehrere Mikrometer lang sein.

Durchschnittlich besitzen SWCNTs eine Oberfläche von bis zu 1.500 m<sup>2</sup>/g, und eine Zugfestigkeit mit mehr als 65 Gigapascal (GPa). Die Elastizitätskraft liegt im Bereich von 1.000 GPa und die Wärmeleitfähigkeit liegt bei 2.000 W/mK. Daraus ergibt sich für einzelne Nanotubes ein mindestens 100fach besseres Verhältnis von Zugfestigkeit zu Dichte als für Stahl.

Je nachdem, wie das wabenartige Netz des Graphit zur Röhre gerollt wird, entstehen helikale, hochsymmetrische oder auch achirale, nicht spiegelsymmetrische Strukturen (Chiralität) (Abb. 2.3 (A 1. - 3.)). Des Weiteren erfolgt eine Unterteilung der achiralen CNTs in „zig-zag-“ und „armchair-“ Strukturen. In Abhängigkeit der Struktur besitzen CNTs entweder metallische oder halbleitende Eigenschaften.

Aufgrund ihrer sehr geringen Löslichkeit und hohen van der Waals Anziehungskräfte formen sie gewöhnlich große Bündel von Aggregaten, die nur sehr schwer zu vereinzeln und deshalb auch problematisch in der industriellen Verarbeitung sind, z.B. bei der

Herstellung von „Composites“. Hilfsmittel zum Erhalt nahezu homogener, stabiler CNT-Lösungen sind entweder stark polare Lösungen (z.B. DMF) (Dumonteil et al., 2006; Ham et al., 2005), amphiphile Moleküle bzw. „Surfactants“ (z.B. Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (Jiang et al., 2003; Strano et al., 2003), Funktionalisierung der Oberfläche oder mechanische Dispergiervverfahren, z.B. durch Ultraschallbehandlung.

Für die Synthese von Kohlenstoff Nanoröhren sind drei verschiedene Methoden bekannt, die sich in der CNT-Ausbeute, Art und Menge sowie Reinheitsgrad der CNTs unterscheiden. Allen gemeinsam ist ein Kohlenstoff-enthaltendes Grundmaterial, hohe Energie und metallische Katalysatoren (Fe, Ni, Mo). Bei der Lichtbogenentladung („Arc Discharge“) werden CNTs durch eine Lichtbogenentladung zwischen zwei Graphit-Elektroden erzeugt, während bei dem Verfahren der Laserverdampfung („Laser Ablation“) ein Graphitblock mit einem Laser beschossen wird, wodurch Kohlenstoff verdampft. Die Chemische Gasphasenabscheidungs-Technik („Chemical Vapor Deposition“, CVD) verwendet als Kohlenstoffquelle unter anderem Acetylen, Kohlenmonoxid (CO) oder  $\text{Fe}(\text{CO})_5/\text{C}_2\text{H}_2$  (Ajayan, 2004; Ren et al., 1998; Zhu et al., 2002). Dieses kohlenstoffhaltige Gas wird zusammen mit Wasserstoff in einem Ofen bei hohen Temperaturen (600°C) über einen mit Katalysatorpartikeln (Eisen, Nickel) beschichteten Träger geleitet. Hierbei entstehen sowohl SWCNTs als auch MWCNTs, die senkrecht auf diesem Träger wachsen.

Nach der Synthese enthält das Produkt neben Kohlenstoff Nanoröhren auch eine Menge an unerwünschten Nebenprodukten, u.a. amorphe Kohlenstoffreste und Metalle, die als Verunreinigungen am CNT-Material haften (siehe Abb. 2.3 (C)) (Tasis et al., 2003).

Die Aufreinigung der synthetisierten CNTs erfolgt unter anderem durch Oxidationsprozesse, Verwendung von Säuren, Erhitzen, Ultraschall-Behandlung, Filtrieren und Funktionalisieren (Georgakilas et al., 2002). Allerdings erhöht sich dabei die Gefahr, dass weitere Nebenprodukte, z.B. funktionelle Gruppen hinzugefügt werden und Nanotubes teilweise beschädigt werden, was wiederum zu einer Ansammlung an CNT-Bruchstücken führt.

Die so erhaltenen oxidierten Nanoröhren lassen sich auch weiter funktionalisieren. An der Innen- oder Außenwand können chemisch selektiv funktionelle Gruppen eingeführt werden, die z.B. die elektrische Leitfähigkeit oder die magnetischen Eigenschaften sowie die Löslichkeit modifizieren (Wong et al., 1998). Hierfür wird z.B. ein Gemisch aus

konzentrierter Salpetersäure und Schwefelsäure unter gleichzeitiger intensiver Ultraschalleinwirkung benutzt (Chen et al., 1998). Als Endprodukt entstehen CNTs, deren Enden und Seitenwände mit einer Vielzahl von sauerstoffhaltigen Gruppen (insbesondere Carboxylfunktionen) bedeckt sind. Diese oxidativ eingeführten Carboxylgruppen sind eine nützliche Ausgangsbasis für weiterführende Modifikation, da sie die kovalente Kopplung von Molekülen oder Nanopartikeln durch Knüpfung von Amid- oder Esterbindungen gestatten. Durch weiteres Funktionalisieren mit verschiedensten Molekülen können CNTs u.a. als Transporter für pharmazeutisch aktive Substanzen oder durch zusätzliche Fluoreszenzmarkierungen in der spezifischen medizinischen und biologischen Analyse verwendet werden. (Abb. 2.3 (B, E)). Zu diesen funktionellen Gruppen gehören u.a. Oligonukleotide (Gigliotti et al., 2006), Peptide (Bianco et al., 2005; Pantarotto et al., 2003; Wang et al., 2003), Nucleinsäuren (Bianco et al., 2005; Williams et al., 2002; Zheng et al., 2003) oder Proteine (Fu et al., 2002; Kam and Dai, 2005).

Kohlenstoff Nanoröhren besitzen als typische Vertreter von Nanopartikeln einzigartige elektrische, chemische, mechanische und thermische Eigenschaften. Außergewöhnlich ist dabei ihre extreme Elastizität bei gleichzeitig hoher Zugfestigkeit.

Aus diesem Grund gibt es eine große Vielfalt von Anwendungsmöglichkeiten in der Elektronik- und Computerindustrie, Luft- und Raumfahrt, aber auch in der Biologie und Pharmazie.

Für die Elektronikindustrie sind vor allem die Strombelastbarkeit und die Wärmeleitfähigkeit sowie Energiespeicherung interessant (Zandonella, 2001). CNTs können als Feldemitter in Flachbildschirmen (Rinzler et al., 1995), Lampen, Mikrowellengeneratoren eingesetzt oder sogar als kleinstes Radiogerät der Welt zusammengesetzt werden (Jensen et al., 2007). Da CNTs auch Halbleiter sein können, lassen sich aus ihnen ebenso leistungsstarke Transistoren fertigen, die höhere Spannungen und Temperaturen als herkömmliche Siliziumtransistoren aushalten (Graham et al., 2005).

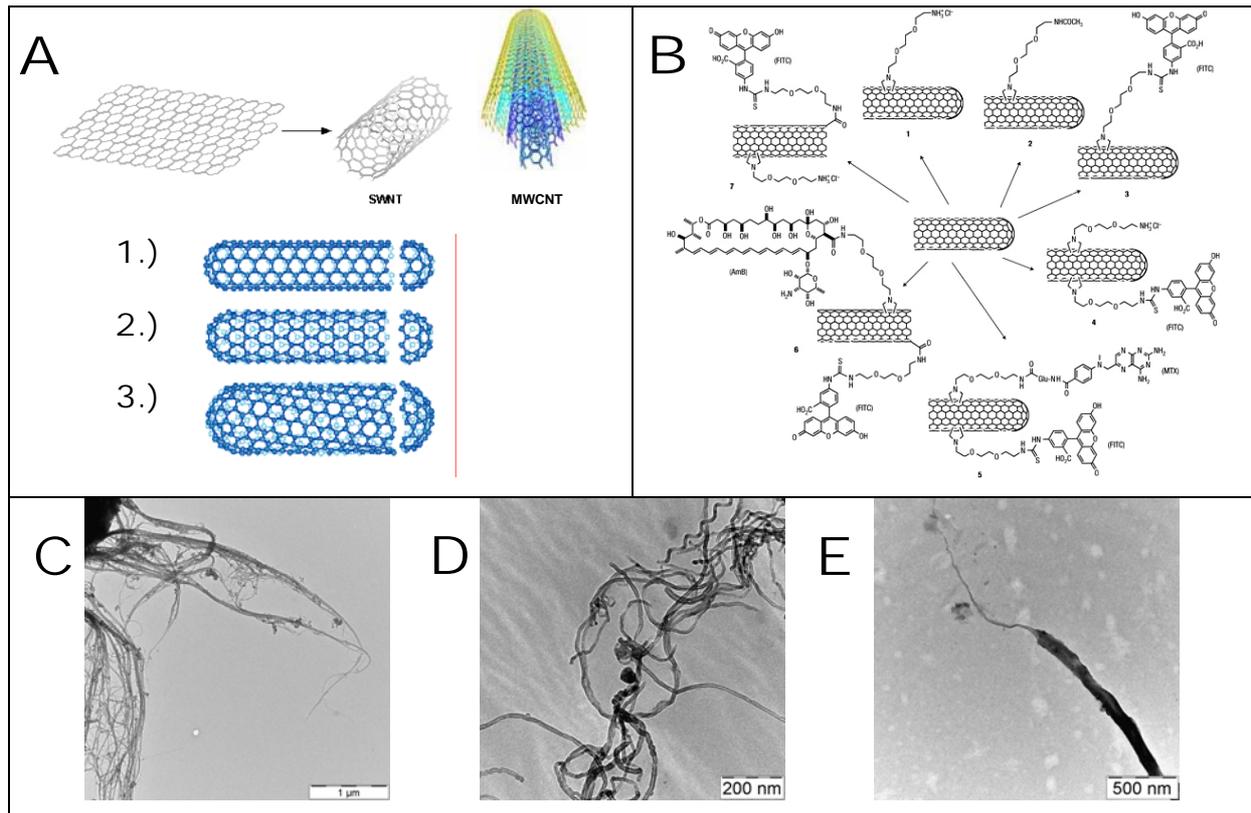
Für die Materialwissenschaft sind vor allem CNT-verstärkte Kunststoffe interessant, die eine hohe Festigkeit bei geringem Gewicht aufweisen, was beispielsweise in der Implantations- und Dentalforschung Verwendung findet (Meng et al., 2005; Wang et al., 2007). Sie können aber auch als Flammenschutzmittel (Kashiwagi et al., 2005) eingesetzt werden.

Weitere Anwendungen liegen gegenwärtig im Bereich der Filterung, Katalyse, „*Tissue Engineering*“ (Lovat et al., 2005; MacDonald et al., 2005), Wundbehandlung und Schutzkleidung (Dalton et al., 2003).

Ein großes potentiell Anwendungsbereich der Nanotubes ist die biologisch-chemische Analyse und Biomedizin (Asuri et al., 2006; Chen et al., 2003; Collins and Avouris, 2000; Kong et al., 2000; Long and Yang, 2001; Son et al., 2007; Zhang et al., 2007). Nanotubes besitzen eine hohe Elastizität und können aufgrund ihrer geringen Größe in der Atomkraftmikroskopie als sensorische Spitzen und Pinzetten verwendet werden, um Objekte und Oberflächen im Nanometerbereich zu erfassen, ohne dabei das Substrat zu zerstören (Cheung et al., 2000; Kim and Lieber, 1999). Weiteres Beispiel ist die spezifische Bindung von Streptavidin an SWCNTs durch Funktionalisierung mit Biotin und Protein-resistenten Polymeren (PEG), (Shim et al., 2002).

Die große optische Absorptionseigenschaft von CNTs im Bereich von 700 - 1.100 nm im Gegensatz zu biologischen Systemen ermöglicht die optische Stimulation der Nanotubes mithilfe der „*Near-Infrared*“ Methode. Die funktionalisierten CNTs könnten so zur spezifischen Bekämpfung von Krebszellen eingesetzt werden (Kam et al., 2005).

Über eine mögliche Toxizität der Nanotubes *in vivo* und *in vitro* ist allerdings noch sehr wenig bekannt und die Ergebnisse sind oftmals widersprüchlich. Ihre große Oberfläche und geringe Löslichkeit, sowie die durch die Synthese entstehenden Verunreinigungen (Katalysatorpartikel, amorpher Kohlenstoff) könnten zu vielfältigen toxischen Effekten führen. Ihre aerodynamische Form und chemische Zusammensetzung könnte cytotoxische Prozesse hervorrufen, die denen von faserartigen Strukturen, z.B. Asbestfasern (Mossman and Churg, 1998; Shukla et al., 2003; Xu et al., 2002; Yegles et al., 1995) oder *Carbon Black* (Renwick et al., 2004; Stone et al., 2000; Sydlik et al., 2006) ähneln. Die besonderen Eigenschaften der CNTs und den damit verbundenen zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten können zu einer schnellen und massiven Verbreitung auf dem Weltmarkt führen. Aus diesem Grund ist eine gründliche Charakterisierung des toxischen Potentials unerlässlich.



**Abb. 2.3: Kohlenstoff Nanoröhren**

(A) Schematische Darstellung eines SWCNTs, bestehend aus einer aufgerollten Graphit-Seite und unterschiedlichen Chiralitäten: 1.) *armchair* 2.) *zigzag* 3.) *chiral*, sowie eines MWCNT, bestehend aus mehreren ineinander geschichteten SWCNTs (Quelle: <http://www.pa.msu.edu/cmp/csc/nanotube.html>). (B) Molekulare Struktur von CNTs mit kovalenter Funktionalisierung von verschiedenen Seitengruppen und kleinen Molekülen (Quelle: Prato et al., 2007). (C) TEM-Aufnahme von SWCNTs (Vergrößerung: 12.000x) (D) TEM-Aufnahme von MWCNTs (Vergrößerung: 30.000x) (E) TEM-Aufnahme von funktionalisierten fSWCNTs (Vergrößerung: 12.000x).

## 2.3 Das Immunsystem - Entzündungsmechanismen

Als Immunsystem wird die Gesamtheit an Zellen, Geweben und Molekülen bezeichnet, die für die Abwehr von Infektionen zuständig sind. Die Aufgabe dieses Systems ist es, vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen. Das Immunsystem kann in die natürliche, angeborene oder auch unspezifische Immunität und in die erworbene (adaptive), spezifische Immunität eingeteilt werden. Eine Zusammenarbeit dieser beiden Formen ist unerlässlich, da der Organismus ständig mit Fremdstoffen, wie z.B. Bakterien, Viren, Partikeln aus der Umwelt in Kontakt kommt und ein ausreichender Schutz gewährleistet sein muss.

Einen primären Schutz liefern die mit Epithelien bedeckten Körperoberflächen, die eine physische Barriere zwischen dem Körperinneren und der Außenwelt mit ihren

Krankheitserregern bilden (Haut, Respirationstrakt und Gastrointestinaltrakt). Wenn ein Mikroorganismus eine Epithelbarriere überwindet und anfängt, sich in den Geweben des Wirtes zu vermehren, wird er in den meisten Fällen durch die Zellen der angeborenen Immunabwehr (Granulocyten, Monocyten, Makrophagen und dendritische Zellen) erkannt und eliminiert. Chemotaktische Substanzen führen zur Aktivierung weiterer Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, die dadurch an den Ort der Entzündung gelockt werden.

Die entwicklungsgeschichtlich älteren Abwehrfunktionen des angeborenen Immunsystems sind schnell aktivierbar oder konstitutiv vorhanden und bei allen Pflanzen, Wirbellosen- und Wirbeltieren verbreitet. Das angeborene Immunsystem hat spezielle Erkennungsmechanismen entwickelt, um Infektionserreger zu detektieren und zu eliminieren. Für die Infektionsabwehr induziert das System eine Entzündungsreaktion und stellt außerdem Effektorleistungen für das adaptive Immunsystem zur Verfügung, z.B. die Präsentation von Antigenen. Zu den dabei aktivierten Abwehrreaktionen gehören u.a. die Sekretion von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen und die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine. Eine Entzündungsreaktion und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren muss genau kontrolliert sein, da die ansonsten positiven Immunreaktionen bei unkontrollierter und übermäßiger Reaktion zu Gewebeschädigungen und chronischen Entzündungen führen können (Lemanske, Jr., 2000). Ein Beispiel übermäßiger Freisetzung von Cytokinen (besonders TNF- $\alpha$ ), die häufig als Ergebnis einer unkontrollierten systemischen Bakterieninfektion auftritt, ist die Sepsis (Blutvergiftung).

Nicht nur Mikroorganismen, sondern auch die Exposition mit natürlichen oder anthropogenen Partikeln, z.B. am Arbeitsplatz, aktivieren die unspezifische Immunabwehr und können bei chronischer Exposition, aufgrund übermäßiger Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zu Entzündungen der Lunge führen (Donaldson and Stone, 2003; Seaton et al., 1995).

Das adaptive oder spezifische Immunsystem unterscheidet sich hingegen vom angeborenen Immunsystem durch die hochspezifische Erkennung eines Antigens durch B- und T-Lymphocyten und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Spezifität für eine große Anzahl verschiedener Antigene wird durch somatische Rekombination, klonale Selektion und Hypermutation gewährleistet.

### 2.3.1 Oxidativer Stress

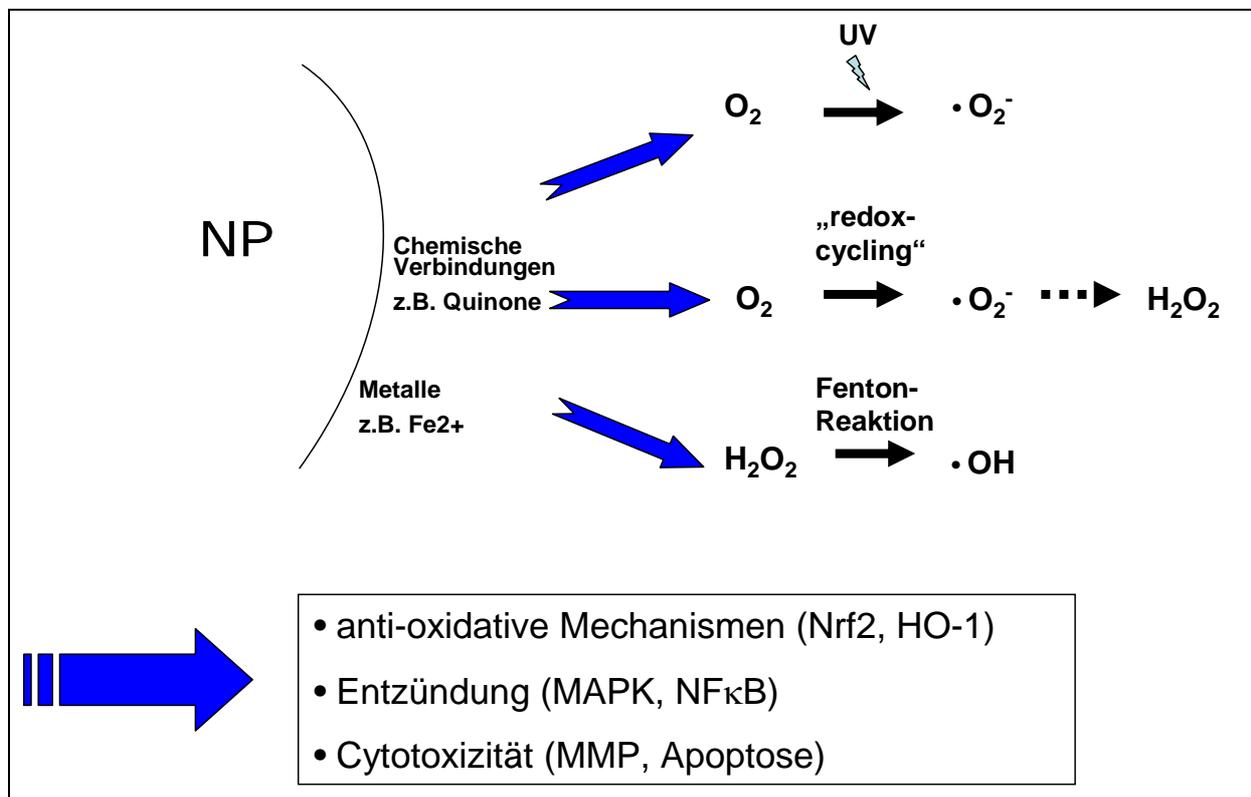
Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS), z.B. Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) werden bei der Energiegewinnung durch Zellen des Immunsystems und in der Umwelt gebildet. Sie zeichnen sich durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aus, wodurch es zu einer erhöhten chemischen Reaktivität kommt. Über die Elektronentransportkette in den Mitochondrien wird zelluläre Energie in Form von ATP bereitgestellt. Während dieses Transfers kann es zur Reduktion von molekularem Sauerstoff zu  $\bullet\text{O}_2^-$  durch Freiwerden einzelner Elektronen kommen (Genova et al., 2004). Außerdem ist es Produkt vieler enzymatischer Reaktionen (NO-Synthase, Xanthin- und NADPH-Oxidase) und der Wirkung ionisierender Strahlung (Ogawa et al., 2003).  $\bullet\text{O}_2^-$  hat nur eine sehr geringe Reaktionszeit und wird durch die Superoxiddismutase (SOD) schnell zum stabilen Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umgewandelt. In Anwesenheit von Metallen, wie z.B. Eisen, kann es allerdings über die Fenton Reaktion zur Bildung der hoch reaktiven Hydroxylradikale ( $\bullet\text{OH}$ ) kommen oder aber  $\bullet\text{O}_2^-$  verbindet sich mit anderen reaktiven Spezies, wie z.B.  $\text{NO}\bullet$  zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ).

Die zellulären Schutzmechanismen werden u.a. durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert, der die Transkription von über 200 antioxidativen- und Entgiftungsenzymen initiiert. Beispiele hierfür sind die Hämoxxygenase-1 (HO-1), Glutathionperoxidase, Katalase und Superoxid Dismutase (SOD). Die Bindung von Eisen durch Transport- und Speichermoleküle (Transferrin und Ferritin) ist ebenfalls ein wichtiger Schutzmechanismus.

Oxidativer Stress bedeutet, dass das Gleichgewicht zwischen der Bildung und Anhäufung von freien Radikalen sowie Sauerstoff- oder Stickstoffspezies und ihrer Elimination gestört ist. Eine Anhäufung von ROS/RNS kann aufgrund von Toxinen, fehlender Antioxidantien (Vitamine E, C und Enzyme), erhöhter Sauerstoff-Exposition, durch die Aktivierung der „natürlichen“ ROS/RNS-Biosynthese, bei chronischen Entzündungen oder partikel-induziert erfolgen (Martin et al., 1997; Nel et al., 2006) (siehe Abb. 2.4).

Das Übermaß an Radikalen kann DNA, Proteine und Lipide (Ho et al., 2002; Leonarduzzi et al., 2000) direkt schädigen, was wiederum zur Apoptose (Hiura et al., 1999) bzw. Nekrose und Induktion von Signalwegen (MAPK,  $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) sowie Verlust des Mitochondrialen Membranpotentials (MMP) führen kann. Hydroxylradikale können z.B. mit Kohlenwasserstoffverbindungen reagieren, Lipidperoxidation hervorrufen oder es

kommt zur Bildung von DNA-Addukten, z.B. 8-Hydroxy-Guanosin (Ahsan et al., 2003). Letztlich führen diese Radikale zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren und einer erneuten Entzündung mit vermehrtem Oxidativen Stress. Pro-inflammatorische Effekte werden durch die redox-sensitiven MAPK und NFκB Kaskaden reguliert, was zu einer Expression von Cytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen führt. Zunehmend werden freie Radikale und erhöhter Oxidativer Stress als Ursache für viele Krankheiten angesehen. Dazu zählen Autoimmun- und Atemwegs-Erkrankungen (Lungenemphysem), Herz-Kreislauf-Krankheiten (Arteriosklerose) und Veränderungen des Nervensystems (Alzheimer und Parkinson) sowie Krebsentstehung. In geringen Konzentrationen bilden Radikale allerdings ebenso auch wichtige Botenstoffe in der Signaltransduktion und Genregulation in einer Vielzahl von Zellen (Lander, 1997).



**Abb. 2.4: Nanopartikel-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)**

Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen welche zur ROS-Bildung führen und die Induktion zellulärer Schutzmechanismen (Nrf2, HO-1), Entzündung (MAPK, NFκB) oder Zelltod mittels Apoptose oder den Verlust des Mitochondrialen Membranpotentials (MMP) auslöst. (verändert nach: Nel et al., 2006)

### **2.3.2 Die Toll-like Rezeptoren und der NF $\kappa$ B-Signalweg**

Anhaltender Oxidativer Stress kann Stress-abhängige Kinasen und redox-sensitive Transkriptionsfaktoren aktivieren und zu Entzündungsmechanismen, wie z.B. die Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine führen (Chan and Murphy, 2003; Gloire et al., 2006; Jaspers et al., 2001; Rahman, 2002; Ryan et al., 2004; Yin et al., 2000; Zhou et al., 2003). Eine Möglichkeit dieser Aktivierung ist die Rezeptorebene und hier insbesondere die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die dabei eine wichtige Rolle spielen können. TLRs sind evolutionär konservierte Glykoproteine mit einer entscheidenden Rolle in der Erkennung von Pathogenen. Der Name leitet sich von dem Toll-Protein ab, dem eine essentielle Bedeutung in der dorso-ventralen Achsenbildung bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zugesprochen wird (Hashimoto et al., 1988). Des Weiteren konnten auch humane homologe Toll-Proteine kloniert werden, welche als Toll-like Rezeptoren bezeichnet werden (Medzhitov et al., 1997). Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von konservierten mikrobiellen Strukturen im angeborenen Immunsystem zeigt sich bei der Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS), einem wichtigen Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998). TLR-Proteine wurden sowohl in *C. elegans* (Rich et al., 2000) als auch in Pflanzen gefunden. Zum Beispiel konnten in *Arabidopsis* Transmembranproteine mit homologen Strukturen isoliert werden, die in der Abwehr von Bakterien eine wichtige Rolle spielen (Gomez-Gomez and Boller, 2000).

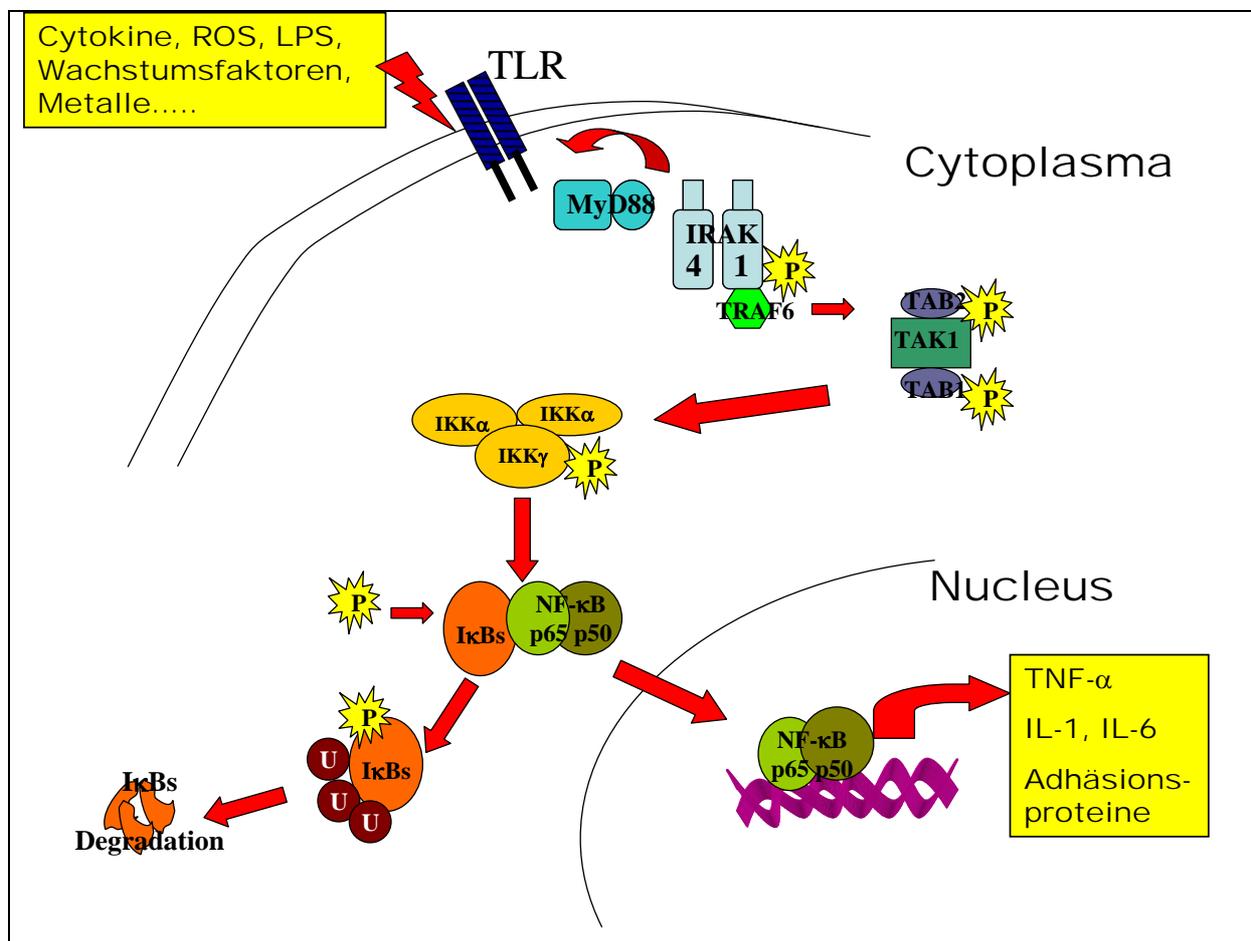
Bis heute sind im Menschen zehn und in der Maus zwölf Toll-like Rezeptoren beschrieben. TLRs sind integrale Typ-I Transmembranproteine, die durch extrazelluläre Leucin-reiche Wiederholungsmotive und eine cytoplasmatische Signaldomäne, die homolog zu der des Interleukin-1-Rezeptors ist (TIR Domäne), charakterisiert sind. Sie werden unter anderem auf Monozyten und Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Endothelzellen sowie auf Zellen der lymphatischen Gewebe exprimiert (Akashi et al., 2000; Faure et al., 2000; Takeda et al., 2003; Underhill et al., 1999). Die Expression der einzelnen TLRs ist zelltyp- und rezeptorabhängig. Die TLRs 1,2,4,5 und 6 sind an der Zelloberfläche lokalisiert, während sich TLR 3,7,8 und 9 im Endosom bzw. Lysosom oder Endoplasmatischen Reticulum befinden (Hacker et al., 2000; Matsumoto et al., 2003). TLRs erkennen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Liganden, z.B. Lipopeptide (TLR 1, TLR 2 und TLR 6) und Nucleinsäuren (TLR 7, TLR 8 und TLR 9). TLR 4 erkennt verschiedene exogene und endogene Liganden, z.B. LPS.

Die Aktivierung von TLRs durch einen Liganden führt zu einer Signalkaskade, die letztlich zur Induktion von Genen führt, deren Produkte als Teil der Immunabwehr eingesetzt werden, die wiederum selbst als Liganden von TLRs dienen und so einen positiven Rückkopplungsmechanismus bilden.

Nach Aktivierung kommt es zur Dimerisierung der TLRs (im Fall von TLR 2 zu Heterodimeren mit TLR 1 und TLR 6 (Ozinsky et al., 2000); für TLR 4 wurden Homodimere beschrieben (Zhang et al., 2002). Das induziert vermutlich eine Konformationsänderung (Gay et al., 2006), welche die Bindung von Adaptorproteinen an die intrazelluläre Rezeptordomäne ermöglicht. Bislang sind fünf Adaptorproteine bekannt, wobei MyD88 („*myeloid differentiation primary-response protein 88*“) von besonderer Bedeutung ist (Hacker et al., 2000; Hayashi et al., 2001; Hemmi et al., 2002; Medzhitov et al., 1998). Die Stimulation der TLRs durch verschiedene Liganden induziert unterschiedliche Antwortprofile, welche sich durch die spezifische Nutzung der fünf Adaptormoleküle erklären lassen (Yamamoto et al., 2002). MyD88 ist entscheidend für die Signaltransduktion aller TLRs mit Ausnahme von TLR 3, welcher ausschließlich TRIF als Adaptorprotein benutzt. Die Signalweiterleitung über TRIF wird häufig als MyD88-unabhängiger Signalweg bezeichnet. TLR 4 kann sowohl den MyD88-abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg nutzen. In Abb. 2.5 ist die schematische Übersicht der Stimulation von TLRs, die den MyD88-abhängigen Signalweg nutzen, dargestellt. Die Aktivierung durch Liganden führt zur Rekrutierung des Adaptorproteins an den Rezeptor und anschließenden Komplexbildung und Autophosphorylierung der IRAKs („*IL-1R-associated kinase*“). Das führt zu einer Aktivierung von verschiedenen Kinasen, darunter TRAF-6 („*tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor-6*“) und schließlich zur Aktivierung des IKK-Komplexes durch IKK-induzierte Phosphorylierung und anschließender Aktivierung von NFκB (Abb. 2.5).

NFκB ist ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, der durch verschiedene oxidative Stimulanzen aktiviert werden kann und die Expression einer Reihe von Chemokinen, Cytokinen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren reguliert (Chen et al., 1999; Schreck et al., 1991). Es sind bisher fünf verschiedene Untereinheiten der NFκB Familie bekannt: NFκB1 (p50 bzw. p105), NFκB2 (p52 bzw. p100), RelA (p65), RelB und c-Rel (Baldwin, Jr., 1996). Jeweils zwei Untereinheiten können in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und auf diese Weise Dimere bilden. NFκB kann über viele verschiedene Signale aktiviert werden. Dazu zählen Cytokine, Partikel, toxische

Metalle, intrazellulärer Oxidativer Stress, UV-Strahlung sowie bakterielle Bestandteile (Chen and Shi, 2002; Karin and Ben-Neriah, 2000; Pahl, 1999). In unstimulierten Zellen befindet sich NF $\kappa$ B als inaktive Form, verbunden mit einem inhibitorischen Molekül (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ , p105 oder p100) im Cytoplasma. Die NF $\kappa$ B Signalkaskade wird aktiviert durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B, das sich von NF $\kappa$ B löst und durch Polyubiquitinylierung mit anschließender Degradation durch Proteasomen abgebaut wird. Der freigesetzte Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B transloziert in den Nucleus und bewirkt dort die Transkription von pro-inflammatorischen Genen, wie z.B. von Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmolekülen sowie Apoptosemarkern (Chen et al., 2001).



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der Aktivierung von NF $\kappa$ B über TLRs und den MyD88-abhängigen Signalweg

Die Aktivierung von NF $\kappa$ B kann über den Toll-like Rezeptor durch verschiedenartige Liganden erfolgen. Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Signalkaskade über das Adaptorprotein MyD88, welche schließlich über verschiedene Komplexbildungen und Kinasenaktivierungen die Phosphorylierung des inhibitorischen I $\kappa$ B bewirkt. Dies führt zur Degradation von I $\kappa$ B, Freisetzung und Aktivierung von NF $\kappa$ B. Es erfolgt die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern, wodurch die Transkription verschiedener pro-inflammatorischer Gene induziert wird.

## 2.4 Zelladhäsion - „Focal Adhesions“

Interaktionen der Zelle mit der extrazellulären Matrix (EZM) bestimmen das Verhalten von Zellen und spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen und inflammatorischen Prozessen, z.B. in der Embryonalentwicklung und Morphogenese, Wundheilung und malignen Transformationen. Die extrazelluläre Matrix bestimmt die physikalischen Eigenschaften des Bindegewebes und beeinflusst die Zellen in ihrer Differenzierung, Migration und Proliferation. Die Matrix wird dabei von den in ihr liegenden Zellen (Fibroblasten, Myofibroblasten, Lipoblasten, Osteoblasten und Chondroblasten) gebildet. Nach Art und Funktion des betreffenden Organs besitzt die Matrix eine unterschiedliche Zusammensetzung und vielfältige Strukturen, von steinhartem Knochen über elastische Bänder bis zu spezialisierten Grenzschichten (Basalmembran).

Viele der zellulären Effekte und Wechselwirkungen zwischen der extrazellulären Matrix und dem Cytoskelett der Zellen werden durch die Familie der Integrinrezeptoren vermittelt (Hynes, 1992). Sie sind sowohl mechanische Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und Cytoskelett als auch Rezeptor für Signale von der EZM. Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Glykoprotein-Untereinheit, und bilden die über 25 verschiedenen, ligandenspezifischen und z.T. gewebe- bzw. zelltypspezifischen Integrinrezeptoren (Humphries et al., 2006; Luo et al., 2007). Die extrazelluläre Domäne bindet an Bestandteile der EZM, z.B. Fibronectin und Laminin, während die cytoplasmatische Einheit in Verbindung mit dem Aktin Cytoskelett sowie Integrin-bindenden Proteinen, z.B. Talin und Adaptorproteinen, z.B. Paxillin und Vinculin, sowie Enzymen, z.B. FAK und Src, steht (Yamada and Miyamoto, 1995).

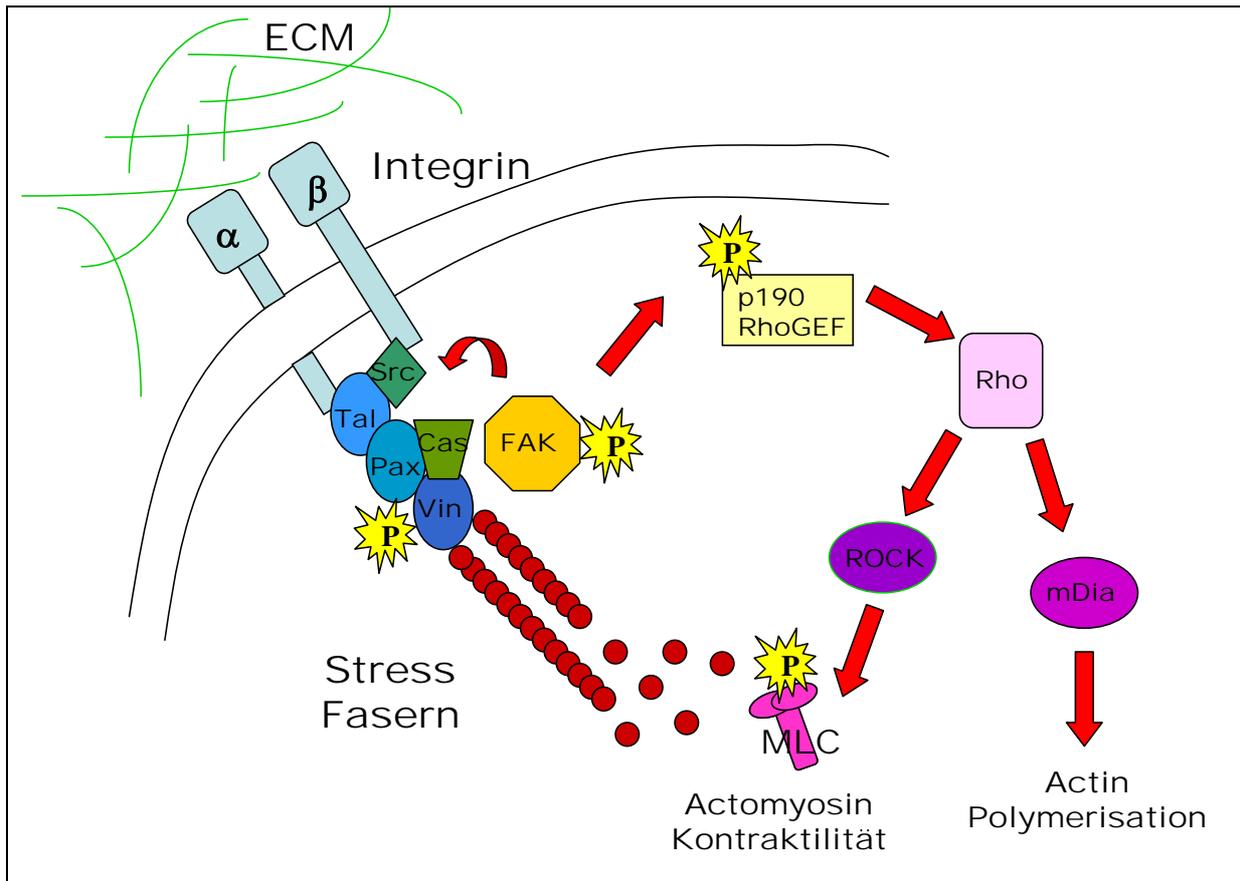
Nach Ligandenbindung kommt es zur Clusterbildung der Integrine in Form von Transmembran Komplexen, den so genannten „Focal Adhesions“ (BurrIDGE et al., 1988). 1971 wurden „Focal Adhesions“ mittels TEM-Aufnahmen zum ersten Mal von Abercrombie et al. (1971) als elektronendichte Regionen der Plasmamembran beschrieben, die in direktem Kontakt mit dem Substrat kultivierter Zellen stehen.

Die Signalübertragung der extrazellulären Matrix erfolgt über die *Focal Adhesion Kinase* (FAK). Diese ist eine cytoplasmatische 125-kDa große Tyrosin Kinase und ein wichtiger Regulator der „Focal Adhesion“-Aktivierung und Komplexbildung (Juliano and Haskill, 1993; Schaller et al., 1992). Die Integrin-abhängige Autophosphorylierung dieser Kinase an Tyrosin 397 (Y397) führt zur Interaktion mit Src und Adaptorproteinen, z.B. Paxillin und Vinculin, welche wiederum weitere Proteine der Signalkette aktivieren können und

mit dem Aktin Cytoskelett verbunden sind (Leong et al., 1995). Das Cytoskelett besteht aus drei Klassen filamentöser Strukturen, F-Aktin, die Intermediärfilamente sowie Mikrotubuli, deren Veränderung zu Stressfasern, die in Fokalen Adhäsionspunkten enden, durch die Aktivität der FAK reguliert werden kann (Jockusch et al., 1995). Stressfasern bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten im Cytoplasma von Zellen. In diesen Fasern sind Aktin und Myosin so angeordnet, dass es zu einer Spannung und Kontraktion kommt. Dabei hat sich gezeigt, dass die Bildung von „*Focal Adhesions*“ und Stressfasern über einen bidirektionalen RhoA-abhängigen Signalweg reguliert wird (Ren et al., 2000; Sinnott-Smith et al., 2001) (Abb. 2.6). Die Rho-Familie von Guanin Nucleotiden (GTP)-Bindungsproteinen besteht aus Rho, Rac und Cdc42 Unterfamilien (Satoh and Kaziro, 1992). Diese Proteine existieren in zwei Formen, der GDP-gebundenen inaktiven und GTP-gebundenen aktiven Form. Aktive GTPasen interagieren mit ihren spezifischen Bindungspartnern. Die GTP-GDP Reaktionen werden u.a. durch sogenannte GEFs („*Guanine Nucleotide Exchange Factors*“) und GAPs („*GTPase-activating Proteins*“) reguliert (Clark et al., 1998; Hall, 1998; Jaffe and Hall, 2002; Lakshman et al., 2007). Die aktivierte Rho-Kinase (ROCK) phosphoryliert die Untereinheit von MLC („*Myosin Light Chain*“) (Amano et al., 1996), inaktiviert die MLCP („*Myosin Light Chain Phosphatase*“) (Kimura et al., 1996) und erhöht damit letztlich die Bindung von Myosin an Aktinfilamente und die Bildung von Stressfasern (Amano et al., 1997; Matsumura et al., 2001; Watanabe et al., 2007). Weitere Substrate ist die Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase und p140mDia, welche die Aktin Polymerisation regulieren (Watanabe et al., 1997). Die Bildung von Stressfasern führt letztlich wiederum zur Integrin-Aggregation und „*Focal Adhesion*“ Bildung (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996).

Die Regulation von FAK kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Dazu gehört die transkriptionelle Ebene, alternatives Splicen und der Phosphorylierungsstatus durch Phosphatasen (Hanks et al., 2003).

Die Integrine bilden somit eine Verbindung zwischen dem Inneren und Äußeren der Zelle. Die Interaktion der EZM mit Integrinrezeptoren spielt aber nicht nur bei der Zelladhäsion eine wichtige Rolle, sondern wird ebenso mit der Regulierung verschiedener Zielgene, die verantwortlich sind für Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod in Verbindung gebracht. Es ist z.B. bekannt, dass Veränderungen der EZM-Integrin Interaktion zu einer Umgestaltung der zellulären Morphologie sowie des Zellverhaltens führen (Chen et al., 1997; Folkman and Moscona, 1978; Roskelley et al., 1994).



**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung der Aktivierung von „Focal Adhesions“ und Stressfasern über pFAK und Rho

Die Aktivierung von Integrinen durch Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) führt zur Autophosphorylierung der „Focal Adhesion Kinase“ (FAK) und Signalweiterleitung über die Rekrutierung und Aktivierung von Adaptorproteinen (Paxillin, Vinculin) und Enzymen (Src), die mit dem Aktin Cytoskelett verbunden sind. Die Bildung von Stressfasern wird über einen bidirektionalen RhoA-abhängigen Signalweg vermittelt, der mithilfe der Rho-Kinase (ROCK) zu einer verstärkten Bindung von Myosin an Aktinfilamente und die Bildung von Stressfasern sowie „Focal Adhesions“ führt. Weiteres Substrat von Rho ist p140mDia, welche die Aktin Polymerisation reguliert.

Entzündliche Veränderungen, sowie Prozesse der Adhäsion sowohl über Rezeptoren als auch Integrine könnte ein interessanter Signalweg, ausgelöst durch die CNTs sein. Diese Zusammenhänge aufzuklären war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Chemikalie	Vertrieb
2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1)	Roche Applied Science, Mannheim
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H <sub>2</sub> DCF-DA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3-Morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Annexin-V-FITC	BD PharMingen™, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Casyton®	Schärfe Systems, Reutlingen
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Applied Science, Mannheim
Dihydroethidium (DHE)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dihydrorhodamine 123	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ECL Plus™ Western Blotting Detection	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethylendiamin tetraessigsäure (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Etoposid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FCS (Foetal calf serum)	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe

Glutaraldehydlösung	Merck – VWR International GmbH, Darmstadt
HEPES	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Igepal CA-6030 (NP-40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lipopolysaccharid ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N,N-Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N-Acetyl-L-Cysteine (NAC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumcacodylat	SERVA GmbH, Heidelberg
Natriumcarbonat	Merck – VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck – VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck – VWR International GmbH, Darmstadt
Natrium-Orthovanadate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Oleoyl-L- $\alpha$ -lysophosphatidic acid sodium salt (LPA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Osmiumtetroxid	SERVA GmbH, Heidelberg
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH Life Sciences, St. Leon- Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin Lösung	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe
Phalloidine Rhodamine	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenylmethyl-sulfonyl-fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Polyklonales Rabbit/Mouse Serum	Dako, Glostrup, Denmark
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Saccharose	Merck – VWR International GmbH, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck – VWR International GmbH, Darmstadt
Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30)	Polysciences Inc., Warrington, PA, U.S.A
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt

Die in dieser Arbeit im Rahmen der Proteindiagnostik eingesetzten Antikörper sind in Kapitel 3.10.6, die im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Antikörper in Kapitel 3.11.1 aufgelistet.

### 3.2 Laborgeräte und Programmsoftware

Gerät/Software	Vertrieb
Analysewaage Sartorius 1602 MP	Sartorius AG Mechatronik, Göttingen
Brutschrank CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Christ, Fellbach
Casy®1	Schärfe Systems, Reutlingen
Digifuge	Heraeus, Fellbach
Durchflusszytometer Flow Cytometer BD LSR II (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Electrophoresis PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar

Improvision Volocity 4, Grid Convocal	Improvision, Coventry England
Fluoreszenzreader Software: Lambda KC4 2.7	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Hamamatsu Orca-ER Digital Kamera (C4742-80-12AG)	Hamamatsu Photonics K.K., Japan
Heidolph Polymax 1040 Schüttler	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge</i> 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg
Microplate-/ Absorptions- Reader Software: SOFTmax Pro 3.1	VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, U.S.A
Sonifier 250	Branson, Danbury, CT, U.S:A
Sterilbank Lamin Air® HB 2460	Heraeus Christ, Fellbach
Tischzentrifuge <i>Centrifuge</i> 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) EM 109T	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Ultramikrotom UC6	Leica

### 3.3 Zellkultur

Das Kultivieren von Zellen eukaryotischer Lebewesen wird als Zellkultur bezeichnet. Da diese kultivierten Zellen unter gleich bleibenden Bedingungen vermehrt werden, können so zum einen Tierversuche vermieden und zum anderen reproduzierbare Ergebnisse durchgeführt werden. Auch interindividuelle Unterschiede entfallen, da immer wieder dieselbe Zelllinie verwendet werden kann, die von einem Individuum abstammt. Zellkulturen werden in speziellen Nährmedien kultiviert, welche die nötigen Aminosäuren, Salze und Vitamine für ein optimales Wachstum der Zellen bereitstellen. Für die in dieser Arbeit verwendeten adhären A549 Zellen wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) und für die adhären ECV304 Zelllinie das Medium 199 verwendet. Zusätzlich erfolgte eine Anreicherung der spezifischen Komponenten, wie etwa der essentiellen Aminosäure L-Glutamin sowie Antibiotika zur Vermeidung von Kontamination. Ein Hauptbestandteil des Nährmediums ist jedoch das Serum, welches wichtige Hormone, Wachstumsfaktoren, Bindungs- und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer- und Neutralisationssysteme, z.B. Albumin oder Immunglobuline, liefert. Fötale Kälberserum (FKS) wird aus dem Blut von Rinderföten nach der Schlachtung meist

keimarm gewonnen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Brutschrank (Typ B5061 EK/CO<sub>2</sub>) der Firma Heraeus Christ. Für die Weiterpassage der adhärenen Zellen wurde zunächst der Zellrasen mit 1x PBS<sup>-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></sup> gewaschen wodurch u.a. Mediumreste und Calcium/Magnesium entfernt wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit der Peptidase Trypsin, um die Zellen vom Gefäßboden zu lösen und zu vereinzeln. Trypsin ist ein Verdauungsenzym aus dem Dünndarm, welches regioselektiv Peptidbindungen spaltet und in adhärenen Zellkulturen verwendet wird, um den Zellverband zu lösen. Das Ablösen der Zellen erfolgte stets bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank und wurde nach 3 - 4 Minuten durch Zugabe des jeweiligen Zellkulturmediums abgestoppt. Verbleibende Reste des Trypsin/EDTA Gemischs in der Zellsuspension wurden nach Zentrifugation (350xg) durch Verwerfen des Überstandes und anschließender Zugabe von frischem Medium aus der Zellkultur entfernt. Soweit nicht anders erwähnt, stammen alle Zellkulturgefäße von der Firma Greiner, Frickenhausen und Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht. Die Grundmedien sowie alle Medienzusätze, Trypsin/EDTA und Antibiotika wurden von Gibco Life Technologies (Karlsruhe) bezogen.

### **3.3.1 Die A549 Epithel-Zelllinie**

Die A549 Zellen (ATCC, CCL-185, Rockville, MD, U.S.A.) repräsentieren humane Alveolarepithelzellen vom Typ II, welche im Jahr 1972 aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen männlichen Patienten isoliert wurden (Giard et al., 1973). Die Zellen wachsen adhären und bilden ein Monolayer mit einer ungefähren Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden. Die konfluenten Zellen wurden einmal pro Woche passagiert, mit Trypsin/EDTA abgelöst und jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen mit 20 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit Zusätzen in eine neue Flasche überführt.

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- 10% FKS (fötales Kälberserum)
- 15 mM L-Glutamin
- 25.000 U Penicillin G Natrium
- 25 mg Streptomycin Sulfate

**Tab. 3.1: Zusammensetzung des Kulturmediums für A549 Zellen (500 ml)**

### 3.3.2 Die ECV304 Endothel-ähnliche-Zelllinie

Die ECV304 Zelllinie (European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) Salisbury, UK) repräsentiert eine spontan transformierte humane Endothel-ähnliche Zelllinie, welche 1984 aus der Nabelschnurvene eines japanischen Neugeborenen gewonnen wurde (Hughes, 1996). Die Zellen wurden lange Zeit für Endothelzellen gehalten, bis jedoch genauere Analysen gezeigt haben, dass es sich hierbei eigentlich um ein Derivat der humanen Harnblasen-Karzinom-Zelllinie T-24 handelt, das aber dennoch als Modell für Endothel-ähnliche Zellen verwendet werden kann (Bubenik et al., 1973; Dirks et al., 1999; Drexler et al., 2002; Suda et al., 2001). ECV304 Zellen wachsen adhärent und bilden ein Monolayer mit einer ungefähren Verdopplungszeit von 24h. Der konfluente Zellrasen wurde einmal pro Woche mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen mit 20 ml Medium 199 mit Zusätzen in eine neue Flasche überführt.

- Medium 199
- 10% FKS (fötales Kälberserum)
- 15 mM L-Glutamin
- 25.000 U Penicillin G Sodium
- 25 mg Streptomycin Sulfate

Tab. 3.2: Zusammensetzung des Kulturmediums für ECV304 Zellen (500 ml)

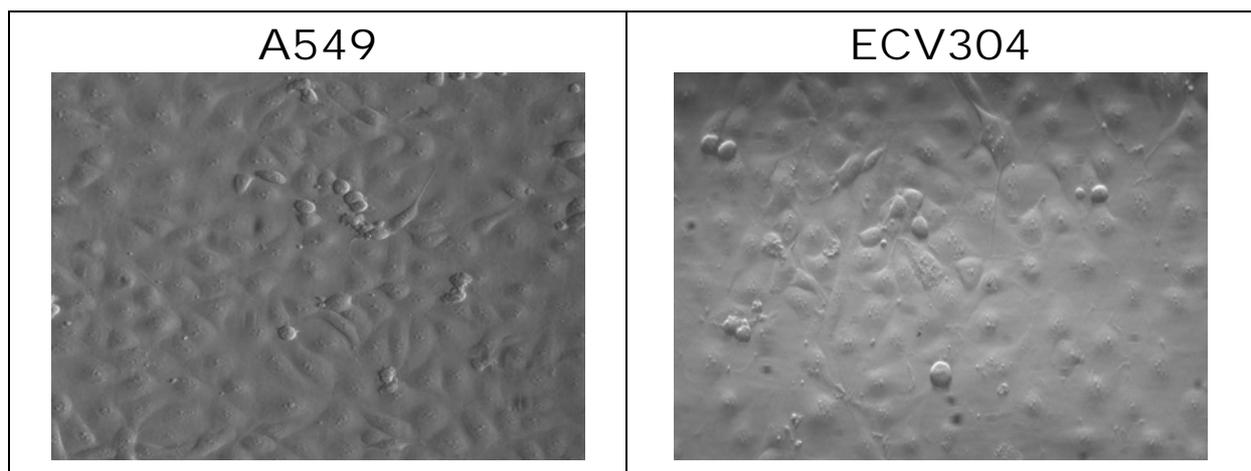


Abb. 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von der verwendeten Epithel- (A549) und Endothel-ähnlichen- (ECV304) Zelllinie

Beide Zelllinien wachsen adhärent und bilden dichte konfluente Monolayer. Im Lichtmikroskop erscheinen die Zellen flach und bilden ein pflastersteinartiges Muster ohne erkennbare Lücken (Vergrößerung: 400x).

### **3.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Sowohl die A549 Zellen als auch die ECV304 bilden adhärenente Monolayer in der Zellkulturflasche aus und müssen deshalb vor jeder Passage mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst werden. Um Reste des Trypsin/EDTA Gemisch aus der Kultur zu bekommen, wurden die Zellen zunächst in ein Bluecap (Greiner) überführt und bei 350xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml frisches Medium aufgenommen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension aus dem Bluecap entnommen und eine Verdünnung von 1:100 mit Casyton® (Schärfe Systems, Reutlingen) hergestellt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mithilfe des CASY® 1 Cell Counters.

### **3.3.4 Langzeitkonservierung von Zellen**

Das Einfrieren von Zellen ermöglicht es, zu beliebigen Zeitpunkten Zellen von jungen Passagen zur Verfügung zu haben und verhindert einen Verlust einer ganzen Zelllinie, aufgrund von z.B. Kontamination. Mithilfe der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  kommen Stoffwechselaktivitäten und Zellvermehrung vollständig zum Erliegen und auch genetische Veränderungen innerhalb der Zelllinie werden so verhindert. Dieser Vorgang der Kryokonservierung ist reversibel, so dass durch das Auftauen jederzeit wieder frische Zellen zur Verfügung stehen.

Das Einfrieren von Zellen birgt die Gefahr, dass Eiskristalle entstehen, die zur Schädigung der Zelle führen. Aus diesem Grund wird 10% DMSO oder Glycerin dem Einfriermedium zugegeben und die Einfriereschwindigkeit sollte  $1^{\circ}\text{C}$  pro Minute nicht überschreiten. Zur Optimierung dieses Prozesses wurde das Gefriergefäß Cryo $1^{\circ}\text{C}$  Freezing Container (Nalgene™, Labware, U.S.A) eingesetzt. Dieses wird mit Isopropanol gefüllt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zu seiner Verwendung vorgekühlt.

Nach Ermittlung der Zellzahl wurde die zum Einfrieren benötigte Anzahl der Zellen bei 350xg für 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Für jedes Kryogefäß wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml eiskaltem Medium (incl. 10% DMSO) vorbereitet. Die Zellen wurden zunächst in einem speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß für 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und in direktem Anschluss bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht gelagert. Für kurzzeitige Konservierung (Tage bis Wochen) ist diese Temperatur

ausreichend. Für eine Langzeitkonservierung (Monate bis Jahre) müssen die Kryogefäße in flüssigem Stickstoff eingelagert werden. Um eine Kontamination der Kulturen zu vermeiden, müssen das Einfrieren sowie das Auftauen von Zellen unter absolut sterilen Bedingungen erfolgen.

### **3.3.5 Das Auftauen von Zellen**

Das Auftauen einer Zellkultur ist im Gegensatz zum Einfrieren ein sehr schneller Prozess. Hierfür muss das benötigte Kulturmedium bereits auf 37°C vorgewärmt und kurz vor dem Auftauen der Zellen in einem Bluecap bereitgestellt werden. Das eingefrorene Kryoröhrchen wurde für den Transport aus dem Stickstoffbehälter in Eis eingebettet und für eine schnelle Auftauprozedur in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Die aufgetauten Zellen wurden danach sofort in das bereits vorgelegte Medium pipettiert. Um das zellschädigende DMSO aus der Kultur zu waschen, wurde die Suspension für 5 Minuten bei 350xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in neuem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

Da die Zellen beim Auftauprozess großem Stress ausgesetzt sind, wurden sie frühestens nach 14 Tagen Kultur für Versuche verwendet.

## **3.4 Verwendete Partikel – Präparation und Aufreinigung**

Die, für diese Arbeit verwendeten einwandigen (*single-walled*) Kohlenstoff Nanoröhren (*Carbon Nanotubes*, CNT) (Ø 1-2 nm) wurden entweder kommerziell von Nanostructured & Amorphous Materials Inc., Los Alamos, USA (NT-1 1280YJ-NMG) erworben oder im Institut für Nanotechnologie, Forschungszentrum Karlsruhe/ Universität Karlsruhe (SWCNT *as prepared* (a.p.), SWCNT *acid treated* (a.t.) und funktionalisierte SWCNT (fSWCNT)) synthetisiert und uns freundlicherweise von Dr. F. Hennrich und Dr. T. S. Balaban zur Verfügung gestellt. *Carbon Black* (CB14, Printex 90; Ø 14 nm; Degussa AG, CAS-No. 1333-86-4) wurde als gut charakterisiertes Referenzpartikel mit bekannten biologischen Eigenschaften zusätzlich verwendet (Tab. 3.3).

Die kommerziell erworbenen NT-1 wurden, wie in der Literatur beschrieben, durch chemische Gasphasenabscheidung („*Chemical Vapor Deposition*“ (CVD)) synthetisiert (Ajayan, 2004) und weisen Reste von Metallverunreinigungen (z.B. Co und Mo ) auf. Die „hauseigenen“ SWCNT a.p., SWCNT a.t. sowie fSWCNT wurden mithilfe der beschriebenen Laserverdampfung hergestellt, indem Graphitblöcke mit gleichen Teilen Ni und Co (Toyo Tanso, Japan) versetzt auf eine Temperatur von 1150°C gebracht werden und verdampfen (Hennrich et al., 2003; Lebedkin et al., 2002). Diese *single-walled Carbon Nanotubes* wurden für die Experimente entweder in Dimethylformamide (DMF)-behandelter Form (SWCNT *as prepared*) mit einem Metallgehalt (hauptsächlich Co und Ni) von ~8 Gewichts-% verwendet oder nach Säure-Behandlung (HNO<sub>3</sub>) (SWCNT *acid treated*, a.t.), um CNTs mit verminderter Metall-Katalysator-Verunreinigung (~2,5%) zu erhalten (Hennrich et al., 2003). Die fSWCNT wurden entsprechend der Methode zur Herstellung von SWCNT a.p. synthetisiert und anschließend mithilfe der Friedel-Crafts Polyacetylierung funktionalisiert. Diese Methode führte zu einem gereinigten *single-walled Carbon Nanotube* Produkt mit einem Coating aus funktionellen Gruppen, das eine Aggregation der CNTs in polaren Lösungen weitgehend verhinderte (Balaban et al., 2006).

Die Partikelsuspensionen (1 mg/ml) wurden in einer 1% SDS Lösung gelagert und direkt vor den Zellkulturversuchen frisch vorbereitet. Zunächst wurden die CNTs in Aceton präzipitiert (21.000xg), in H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen und mehrmals gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Sedimentationsschritt mittels Zentrifugation und die Aufnahme der CNTs in H<sub>2</sub>O bidest. Vor dem Gebrauch der *Carbon Nanotubes* wurden die Partikelsuspensionen mithilfe eines Ultraschallgerätes (Sonifier 250, Branson, Danbury CT, U.S.A) behandelt (Duty Cycle 40%, Output Control 4) und kräftig gevortext, um die Nanotube Aggregate und Bündel aufzubrechen, und um somit eine möglichst gleichmäßige CNT Dispersion zu erhalten. Schließlich wurden die entsprechenden CNT Verdünnungen in Zellkulturmedium hergestellt. Trotz dieser Vorbehandlung zeigten die verschiedenen CNTs oftmals eine starke Zusammenlagerung der einzelnen Tubes zu großen Aggregaten. Auch die weitere Analyse und Charakterisierung der *Carbon Nanotubes* mittels Transmissionselektronenmikroskopie verdeutlichte das ausgeprägte Aggregationsverhalten (Abb. 4.2). In dieser Arbeit wurde jedoch auf die Zugabe von chemischen Zusätzen (z.B. DMSO, DMF) oder *Surfactants* (Tween 80, SDS) verzichtet, um störende Einflüsse in den Zellkulturversuchen zu vermeiden und auch um das

natürlich auftretende Aggregationsverhalten der *Carbon Nanotubes* und die daraus resultierende Toxizität zu untersuchen.

**Tab. 3.3: Materialcharakterisierung und Elementanalyse der verwendeten Partikel (Gewichts-%)**

Material	NT-1**	NT-1*	SWCNT	SWCNT	fSWCNT	CB14
	1280YJ-NMG	1280YJ-NMG	<b>a.p.</b> ***	<b>a.t.</b> ***	***	****
C	84,95		78,3	65,7		
O	3,08		7,1	25,3		
N	0,12		1,1	1,5		
Co	2,8	0,6	4,3	1,3		<0,0005
Cu	0,03					<0,0005
Ni	<0,005		4,3	1,2		<0,001
Fe	0,009					<0,002
Mo	4,2	0,1				
Amorpher Kohlenstoff		<5				>99
Spezifische Oberfläche	400 m <sup>2</sup> /g	400 m <sup>2</sup> /g				300 m <sup>2</sup> /g
Synthese und Aufreinigung	Chemische Gasphasenabscheidung (CVD)	Chemische Gasphasenabscheidung (CVD)	Ni/Co Laserverdampfung und DMF-Be-handlung	Ni/Co Laserverdampfung und Säure (HNO <sub>3</sub> )-Be-handlung	Ni/Co Laserverdampfung und Friedel-Crafts Polyacetyl-ierung	

\* Analyse Daten gemäß des Herstellers

\*\* Analyse mittels ICP-OES am Institut für Material Forschung, Forschungszentrum Karlsruhe

\*\*\* Analyse mittels IR & Atomemmissionsspektroskopie durch F. Hennrich (Institut für Nanotechnologie, Forschungszentrum Karlsruhe)

\*\*\*\* Analyse mittels ICP-MS von Degussa AG (Printex 90)

Die NT-1 *Carbon Nanotubes* wurden für einige Experimente zusätzlich mit DMF (N,N-Dimethylformamide, Sigma) behandelt, um Verunreinigungen des amorphen Kohlenstoffs herauszulösen (Hennrich et al., 2003). Zur Herstellung dieses NT-1 DMF Produktes wurden NT-1 *Carbon Nanotubes* mit DMF in Lösung gebracht, sonifiziert (Duty Cycle

40%, Output Control 4) (Sonifier 250, Branson, CT, U.S.A) und anschließend sedimentiert. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt, bis die CNT Probe schließlich in Aceton präzipitiert, getrocknet und für die Zellkulturversuche vorbereitet wurde.

### **3.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Der Aufbau von Organismen kann sehr gut mit dem Lichtmikroskop untersucht werden. Doch wenn es um die Feinstruktur der Zellen oder um sehr kleine Organismen geht, stößt man schnell an Grenzen, denn durch die Wellenlänge des Lichtes ist auch das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops begrenzt. Da schnelle Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht haben, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (derzeit etwa 0,1 nm) als mit einem Lichtmikroskop ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) erreicht werden. Die Probe wird von Elektronen durchdrungen, die von einer Elektronenquelle, der Kathode, kommen und das vergrößerte Bild entsteht unterhalb der Probe auf einem Schirm. Zur Abbildung verwendet man Magnetspulen, die Elektronenstrahlen bündeln können und somit das stark vergrößerte Bild auf einem Leuchtschirm projiziert werden kann.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in Transwell®-Kultursysteme auf Polycarbonat Membranen (#3412) ausgesät und über Nacht zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Zellen mit  $68,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) der entsprechenden Partikelsuspension behandelt und für 24h inkubiert werden. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Membran kurz in PBS gewaschen und kleine Proben zur weiteren Behandlung aus der Membran ausgestanzt (Biopsy Punch). Die Fixierung der Proben erfolgte mithilfe der Karnovsky's Fixants sowie 1% Osmiumtetroxid auf dem Schüttler für eine Stunde. Anschließend wurden die Membranen mit PBS gewaschen und es folgte die Entwässerung mit aufsteigender Ethanolreihe von 50%, 70%, 95% für 2 Minuten und 100% (getrocknet) und Propylenoxid (getrocknet) für jeweils 5 Minuten. Nun folgte die erste Einbettungsstufe mit einer Mischung von 2/3 Ethanol und 1/3 Einbettungsmedium (EPON 812). Nach 20 Minuten folgte eine Mischung von 1/3 Ethanol und 2/3 Einbettungsmedium wiederum für 20 Minuten und schließlich wurden die Proben in reinem EPON für eine Stunde inkubiert. Die Membranstücke wurden nun vorsichtig mit einer Pinzette in die mit EPON gefüllten

Einbettungsformen überführt. Nach nochmaligem Ausrichten der Membranen konnten die Formen mit Einbettungsmedium vollständig aufgefüllt werden und zum Aushärten über Nacht im Trockenschrank (60°C) polymerisieren.

Von den ausgehärteten Blöckchen wurden mit einem Ultramikrotom (UC6, Leica Microsystems, Wetzlar) Ultradünnschnitte von 70-100 nm Schichtdicke angefertigt und auf, mit Formvar beschichtete, 75 Mesh Kupfergrids aufgebracht. Die TEM-Aufnahmen erfolgten am Zeiss EM109T-Elektronenmikroskop mit einer digitalen Kamera.

Die Charakterisierung der Partikel wurde durch Auftragen der vorbereiteten CNTs auf die beschichteten Kupfergrids, Trocknen über Nacht und Analyse im Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt.

- Karnovsky's Fixants in H<sub>2</sub>O bidest.:
  - 20% Paraformaldehyd (PFA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
  - 25% Glutaraldehydlösung, Merck, Darmstadt
  - 0,2 M Natriumcacodylat-Puffer, pH 7,3, SERVA GmbH, Heidelberg
  - 1% Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer, SERVA GmbH, Heidelberg
- EPON 812 (100ml): Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
  - Lösung A: 29,4 g EPON 812 (=Glycidether 100), 21,8 g DDSA
  - Lösung B: 27,4 g EPON 812, 24,4 g MNA (Methylnadicanhydrat)
  - 1,8 g Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30), Polysciences Inc., Warrington, PA, U.S.A
- Biopsy Punch, Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main
- Transwell®-Kultursystem (Polycarbonat Membran Ø 24 mm, 0,4 µM Porengröße), Corning, NY, U.S.A
- Ultramikrotom UC6, Leica Microsystems, Wetzlar
- Kupfergrids 75 Mesh, Plano, Wetzlar
- Transmissionselektronenmikroskop (TEM) EM 109T, Carl-Zeiss AG, Oberkochen

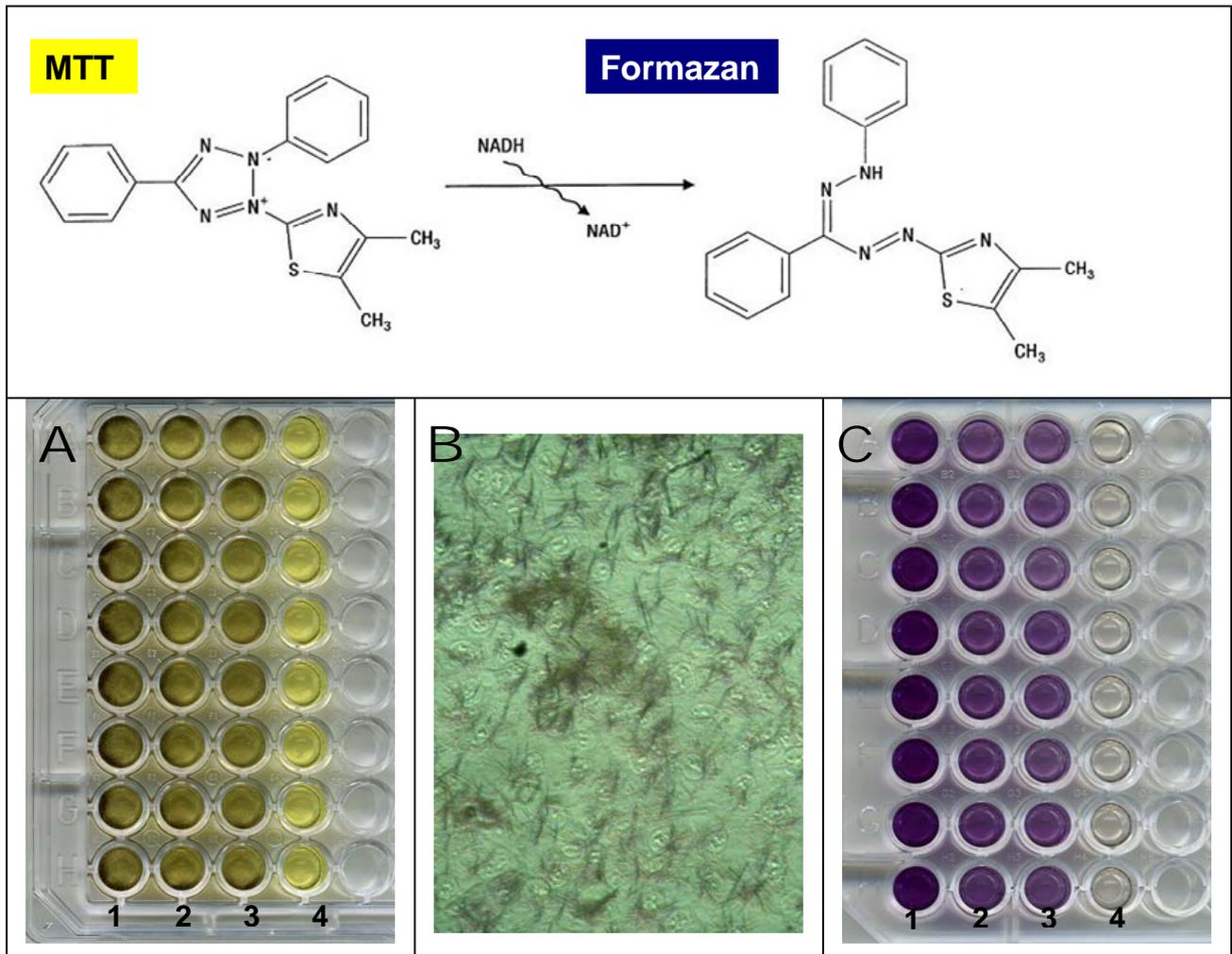
**Tab. 3.4: Material, Puffer und Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

### **3.6 Vitalitätstests**

Vitalitätstests ermöglichen die Untersuchung unterschiedlicher Stoffe auf deren cytotoxisches Verhalten. Dabei wird häufig eine indirekte Methode, z.B. Messung der Stoffwechselaktivität oder Zellmembranintegrität gewählt, um einen Rückschluss auf die Vitalität der Zellen zu bekommen. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Messung der Cytotoxizität der MTT-Test, LDH- und WST-1-Test, sowie die PI-Färbung verwendet, die im Folgenden beschrieben werden.

#### **3.6.1 MTT-Test**

Einen häufig verwendeten Vitalitätstest stellt der von Mosman beschriebene MTT-Assay dar (Mosmann, 1983). Diese Methode beruht auf der Bestimmung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen, indem die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen wird. MTT ist die Abkürzung für das gelbe Tetrazolium-Salz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid. Es wird von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien mittels NADH in einer Succinat-abhängigen Dehydrogenasen-katalysierten Reaktion zu wasserunlöslichen, blauen Formazan-Kristallen reduziert. Für die photometrische Auswertung werden die alkohollöslichen Formazan-Kristalle durch Isopropanol aufgelöst. Um den Einfluss des im Medium vorhandenen pH-Indikators Phenolrot auf die Messung zu minimieren, wird das Isopropanol angesäuert, wodurch sich das Phenolrot gelb färbt und so die Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm am wenigsten stört. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Menge an aktiven Dehydrogenasen, die in lebenden oder proliferierenden Zellen besonders hoch ist (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Reaktion der MTT-Formazanbildung**

(A 1-3) Beim MTT-Assay wird in den aktiven Mitochondrien der Zellen das gelbe Tetrazoliumbromid (MTT) zu blauen, wasserunlöslichen Formazan-Nadeln reduziert. (A 4) Sind die Zellen geschädigt, kann kein oder nur sehr wenig MTT umgesetzt werden. (B) Die nadelförmigen Formazan-Kristalle heben sich deutlich von den hier lichtmikroskopisch abgebildeten A549 Zellen ab (Vergrößerung: 400x). (C 1-4) Die Formazan-Nadeln werden aus den Zellen herausgelöst und die Intensität der Färbung im Absorptionsreader gemessen. Die Stärke der Blaufärbung korreliert direkt mit der umgesetzten Menge an MTT und der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen (Quelle: verändert nach: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Der Test wurde in 96-well Mikrotiter-Platten durchgeführt. Die jeweils letzte Spalte einer Platte diente als Leerwert und wurde nicht mit Zellen beladen. Pro Vertiefung wurden 25.000 Zellen ausgesät und über Nacht zum Anwachsen im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Für die Inkubation wurden die Partikelsuspensionen entsprechend verdünnt und je Probe eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Nach erfolgter Partikelinkubation wurde die Platte zunächst zentrifugiert (350xg, 5 Minuten) und der Überstand für den LDH-Test verwendet (siehe Kapitel 3.6.2). Zu den Ansätzen wurde schließlich eine MTT-Reaktionslösung in einer Endkonzentration von 10% (in HBSS) zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die daraufhin gebildeten Formazan-Kristalle wurden zunächst durch Abzentrifugieren (350xg, 5 Minuten) vollständig sedimentiert, der Überstand verworfen und anschließend die Kristalle mit Isopropanol/HCl in Lösung

gebracht. Durch erneute Zentrifugation konnte gewährleistet werden, dass nur die gelösten Formazan-Kristalle zur Messung in eine neue Platte überführt wurden und eventuell noch vorhandene Zellbruchstücke zurück blieben. Die Proben konnten schließlich im Absorptionsreader bei 550 nm gegen einen Leerwert (Isopropanol/HCl) gemessen werden. Hierbei korreliert die gemessene Absorption mit der Menge an gebildetem Formazan, d.h. je niedriger die Absorption, desto weniger Formazan wurde gebildet und desto geringer ist die mitochondriale Aktivität als Index der Vitalität.

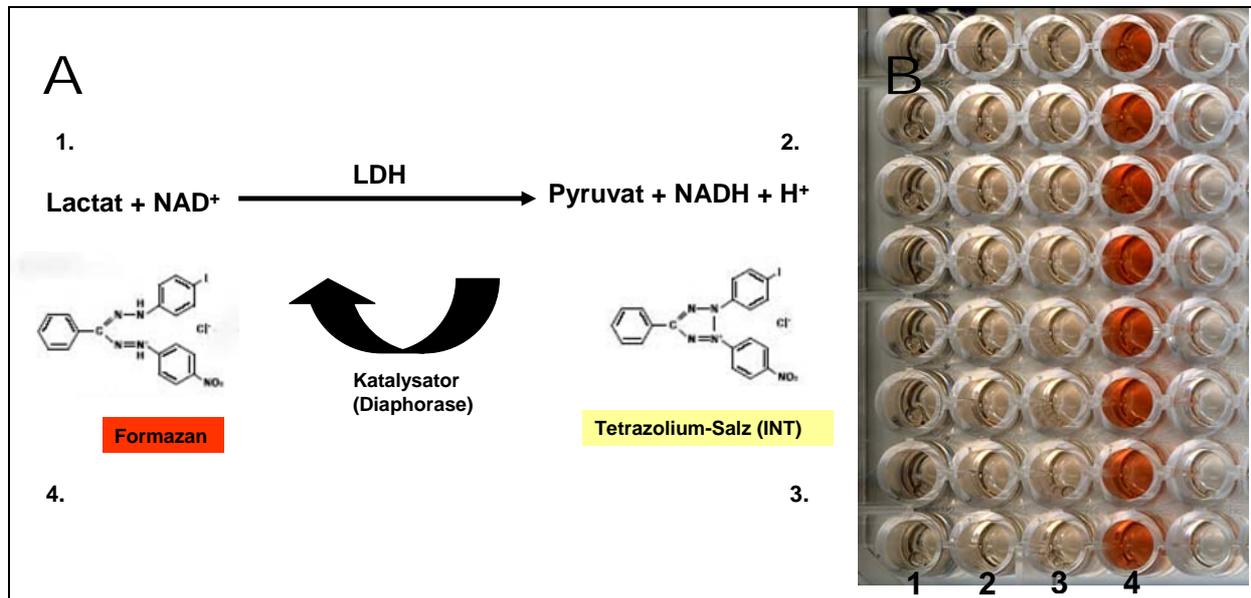
- 10% (in HBSS) 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Isopropanol mit 1% HCl

**Tab. 3.5: Material und Lösungen für den MTT-Test**

### **3.6.2 LDH-Test**

Der LDH-Test ist ein weiterer häufig *in vitro* angewendeter Cytotoxizitäts-Test, dessen Prinzip auf der Bestimmung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Cytoplasma basiert, das aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt wird und somit im Überstand nachweisbar ist. Die LDH-Aktivität wird indirekt mittels eines enzymatischen Tests bestimmt (Abb. .3). Es finden hierbei zwei Redox-Reaktionen statt: Im ersten Schritt wird Laktat durch LDH zu Pyruvat oxidiert, während das Co-Enzym  $\text{NAD}^+$  durch die Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testsystem enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf das schwach gelbbare Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert, während das  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird. Diese Farbstoffbildung kann kolorimetrisch mit einem Absorptionsreader bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen werden. Je höher der Grad der Zellschädigung ist, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Überstand. Die Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen. Als Positivkontrolle dienen Zellen, die unter Zugabe des Detergens Triton-X 100

(1%) vollständig lysiert wurden und deren Substratumsetzung daher als maximal (100%) eingestuft wird (Abb. .3).



**Abb. .3.3: Reaktion des LDH-Tests**

(A 1) Beim LDH-Test wird Laktat durch LDH zu Pyruvat oxidiert. (A 2) Das Co-Enzym  $\text{NAD}^+$  wird durch die Übertragung von Wasserstoff zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert. (A 3) Der im Testsystem enthaltene Katalysator Diaphorase überträgt Wasserstoff vom entstandenen  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz INT. (A 4) INT wird daraufhin zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert und das  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. (B 1-3) Die Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter bzw. vitaler Zellen bei fehlender Cytotoxizität. Der Überstand aus den vitalen Kontroll-Zellen bleibt schwach gelb. (B 4) Durch Zugabe von Triton-X 100 werden die Zellen vollständig lysiert und weisen eine starke Rotfärbung auf, da viel Formazan gebildet wurde (Positivkontrolle) (Quelle: verändert nach: www.roche.de).

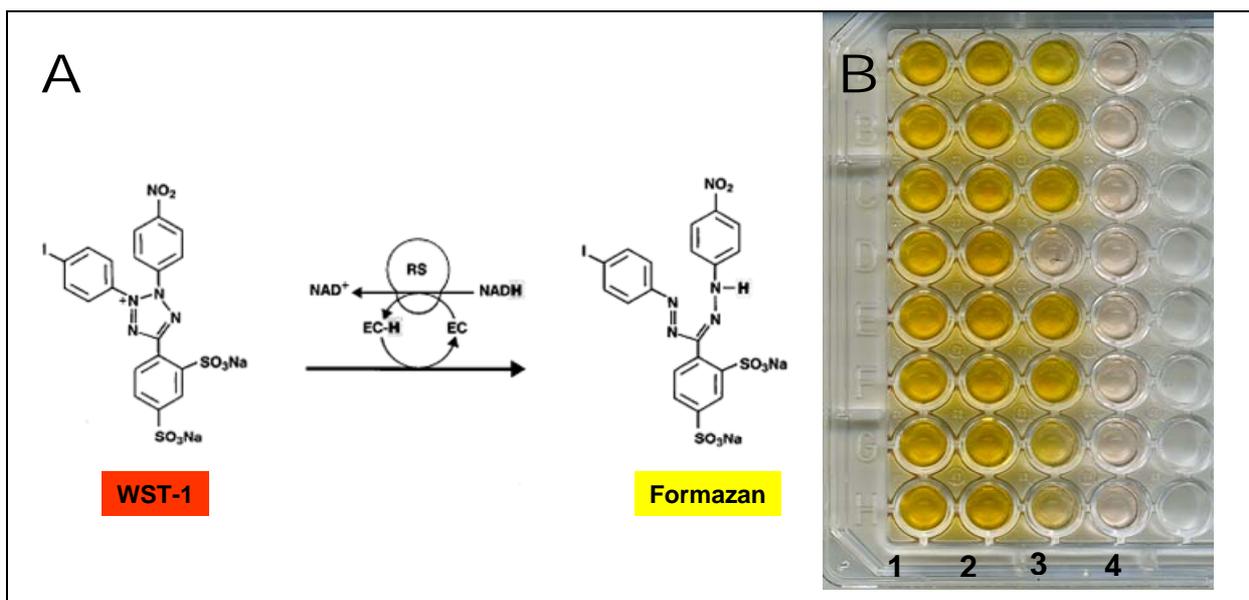
Für die Durchführung des LDH-Tests wurden 25  $\mu\text{l}$  Überstand aus dem Ansatz für den MTT-Test verwendet (siehe Kapitel 3.6.1) und in eine neue Platte überführt, in der schon 75  $\mu\text{l}$   $\text{PBS}^{+\text{Ca}/\text{Mg}}$  pro well vorgelegt worden war. Anschließend konnte die LDH-Reaktionslösung entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und auf die Proben gegeben werden. Die Inkubation wurde im Dunkeln durchgeführt, wobei darauf geachtet werden musste, dass die mit Triton-X 100- (Endkonzentration 1%) behandelten Positivkontrollen nicht zu dunkel wurden, da die Messung im Absorptionsreader ansonsten zu ungenau werden würde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 N HCl abgestoppt und die Proben anschließend im Absorptionsreader gegen einen Leerwert (PBS) gemessen und ausgewertet.

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche Applied Science, Mannheim
- 10% Triton-X 100
- 1 N HCl

**Tab. 3.6: Material und Lösungen für den LDH-Test**

### 3.6.3 WST-1-Test

Neben dem MTT-Test stellt der WST-1-Test eine weitere Methode zur Überprüfung der mitochondrialen Dehydrogenasen dar und kann somit als ein weiterer *in vitro* Vitalitätstest angewendet werden. Hierbei wird wiederum ein Tetrazolium-Salz (schwach rötlich), das 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1), von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien mittels NADH in einer Dehydrogenasen-katalysierten Reaktion zu einem gelben Formazan-Farbstoff reduziert. Die photometrische Auswertung erfolgt bei 450 nm im Absorptionsreader. Im Unterschied zum MTT-Test entsteht hier ein wasserlöslicher Formazan-Farbstoff, der direkt und ohne Isopropanol/HCl Extraktion gemessen werden kann. Die Intensität der Gelbfärbung korreliert wiederum mit der Menge an aktiven Dehydrogenasen und so mit der Anzahl der vitalen bzw. proliferierenden Zellen (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Reaktion des WST-1-Tests zur Formazan-Bildung**

(A) Beim WST-1-Assay wird in den aktiven Mitochondrien der Zellen das rötliche Tetrazolium WST-1 zum gelben Formazan-Farbstoff reduziert. (B) Sind die Zellen geschädigt, kann kein oder nur sehr wenig WST-1 umgesetzt werden. (B 1-3) Die Stärke der Gelbfärbung korreliert direkt mit der umgesetzten Menge an WST-1 und der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. (B 4) Durch Zugabe von Triton-X 100 werden die Zellen lysiert und können deshalb das Tetrazolium nicht umsetzen. Die Lösung bleibt schwach rötlich (Positivkontrolle) (Quelle: verändert nach: www.roche.com).

- WST-1, Roche Applied Science, Mannheim

**Tab. 3.7: Material und Lösungen für den WST-1-Test**

Für die Durchführung des WST-1-Tests wurden die Zellen gemäß der Vorschrift für den MTT-Test in Mikrotiter-Platten ausgesät und angesetzt (siehe Kapitel 3.6.1). Nach erfolgter Partikelinkubation wurde die Platte zunächst zentrifugiert (350xg, 5 Minuten) und der Überstand verworfen. Zu den Ansätzen wurde schließlich 10% WST-1-Reaktionslösung (in HBSS) zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der daraufhin gebildete Formazan-Farbstoff wurde in eine neue Platte überführt und im Absorptionsreader bei 450 nm gegen einen Leerwert (HBSS) gemessen. Hierbei korreliert die gemessene Absorption mit der Menge an gebildetem Formazan-Farbstoff, d.h. je geringer die Absorption war, desto weniger Formazan wurde gebildet und desto geringer war die mitochondriale Aktivität der Dehydrogenasen als Index der Vitalität.

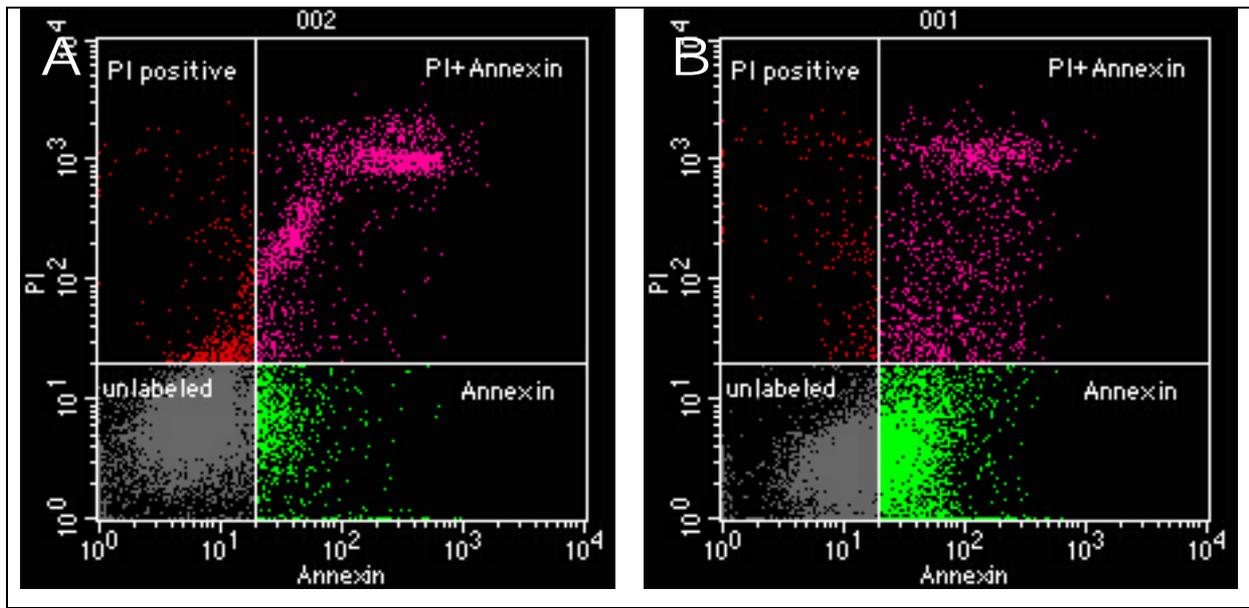
### **3.7 Durchflusszytometrie**

#### **3.7.1 Unterscheidung und Quantifizierung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin V-FITC/Propidiumiodid Färbung**

Die Verwendung zweier Fluoreszenzfarbstoffe, dem FITC-gekoppelten Protein Annexin V sowie Propidiumiodid ermöglicht die Unterscheidung und Quantifizierung vitaler und nekrotischer Zellen. Veränderungen der Plasmamembran werden als eines der ersten Anzeichen apoptotischer Zellen beschrieben. Dabei kommt es zu einer Umverteilung des cytoplasmaständigen Membranlipids Phosphatidylserin (PS), welches im frühen Stadium der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran umverteilt wird. Annexin V ist ein 35 - 36 kDa,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS. Es bindet an Zellen, welche PS auf der Außenseite tragen und repräsentiert somit einen sensitiven Marker für apoptotische Zellen. Für eine bessere Identifizierung ist Annexin V an das Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt und zeigt nach spezifischer Anregung eine grüne Fluoreszenz.

Da jedoch die Translokation von PS auch während nekrotischer Prozesse stattfindet sowie durch den Verlust der Membranintegrität Löcher in der Zelle entstehen, kann Annexin V auch nekrotische Zellen färben. Aus diesem Grund wird daher mit einem zweiten Farbstoff, dem Propidiumiodid (PI), gegengefärbt. PI ist ein Vitalfarbstoff, der aufgrund seiner Größe nur durch perforierte Zellmembrane hindurch diffundieren kann und mit der

DNA interkaliert, wobei ein fluoreszierender Farbstoff entsteht (Koopman et al., 1994; Vermes et al., 1995). Nach dieser Färbemethode können nun drei Populationen unterschieden werden, nämlich ungefärbte (vital), nur Annexin V (apoptotisch), oder PI und Annexin V gefärbte Zellen (nekrotisch), und im Dot Blot dargestellt werden (siehe Abb. 3.5).



**Abb. 3.5: Dot Blot Analyse von Propidiumiodid- und Annexin V-FITC-Färbung**

(A) Die unbehandelte Kontrolle zeigt eine große Anzahl von ungefärbten, vitalen Zellen (unlabeled). (B) Die mit Etoposid (50  $\mu$ M, 24h) behandelte positiv Kontrolle zeigt eine deutliche Induktion von Apoptose (grün gefärbte Zellen, Annexin) sowie eine Zunahme von doppelt gefärbten, nekrotischen Zellen (PI+Annexin).

Für die Durchführung wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung einer 6-well Platte ausgesät und 24h zum Anwachsen in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die entsprechenden Partikelsuspensionen hergestellt und die Zellen im Brutschrank bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Alle Schritte der Probenaufbereitung erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden zunächst gründlich mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Boden gelöst, 5 Minuten zentrifugiert (350xg) und nochmals mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde schließlich in 400  $\mu$ l kaltem Calcium-Bindungspuffer resuspendiert und 100  $\mu$ l Zellsuspension für die Färbung verwendet. Jede Probe wurde mit 5  $\mu$ l Annexin V-FITC und 1  $\mu$ l einer 1 mg/ml PI-Stammlösung (Endkonzentration 1  $\mu$ g/ml) versetzt und für 15 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Vor der Probenmessung musste das Durchflusszytometer auf die Eigenfluoreszenz der Zellen sowie auf die Rot- bzw. Grünfluoreszenz der Farbstoffe geeicht bzw. kompensiert werden. Dies erfolgte mit einer ungefärbten, nur Annexin V-FITC, nur PI und einer doppelt gefärbten Probe. Als Positivkontrolle wurde Etoposid (50  $\mu$ M) verwendet, ein

Derivat des Podophyllotoxins, das die Topoisomerase II hemmt, die Cytokinese unterdrückt und somit pro-apoptotisch wirkt.

Im Durchflusszytometer werden die Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, das grün fluoreszierende FITC in Kanal FL-1 (530 nm) und das rot fluoreszierende PI in Kanal FL-6 (610 nm) detektiert. Je Probe wurden 10.000 Ereignisse gezählt.

- Annexin-V-FITC, BD PharMingen™, Heidelberg
- Propidiumiodid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Etoposid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Calcium-haltiger Bindungspuffer in H<sub>2</sub>O bidest.:
  - 10 mM Hepes (pH 7,4)
  - 140 mM NaCl
  - 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- Durchflusszytometer Flow Cytometer BD LSR II (FACS), Becton Dickinson, Heidelberg

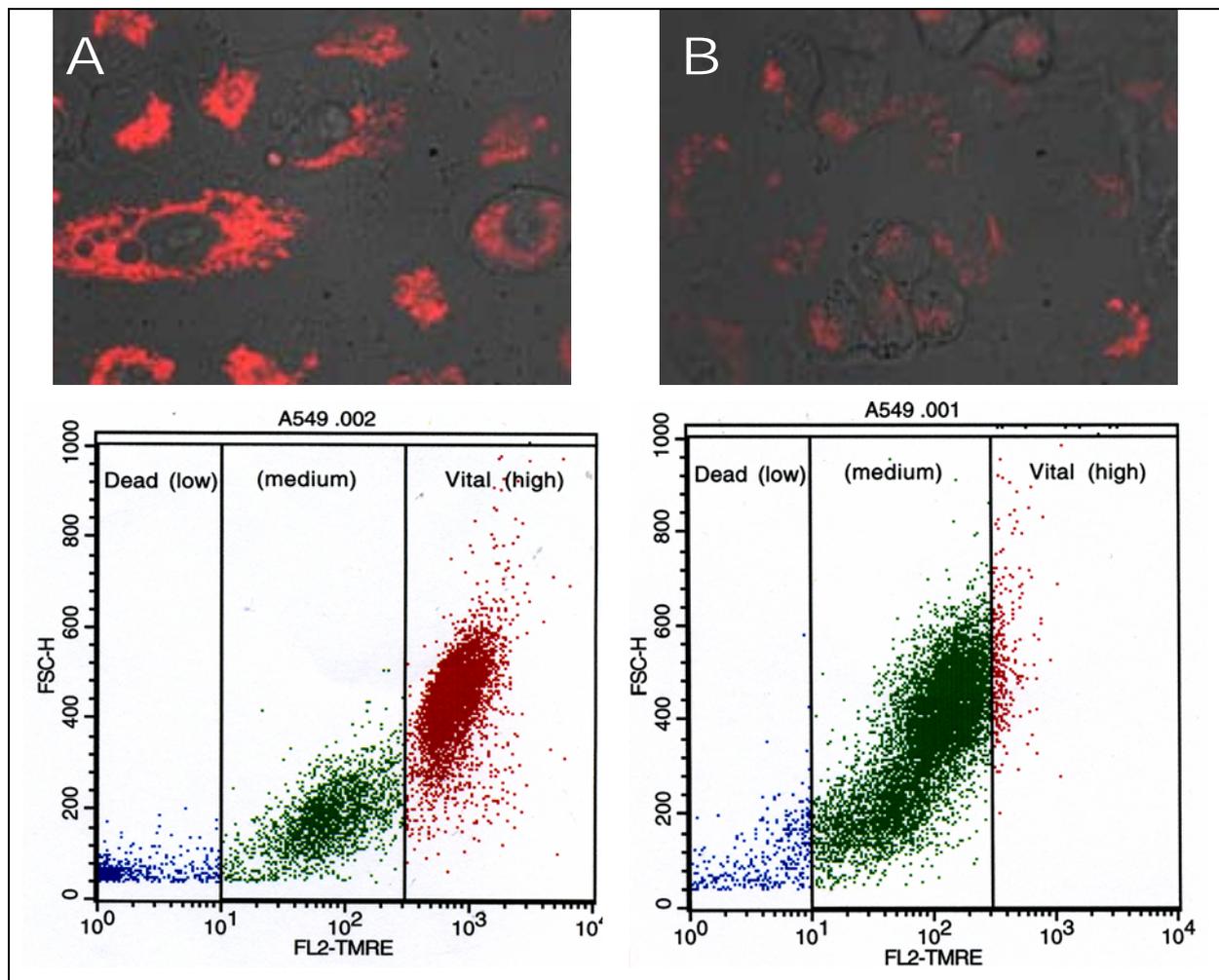
Tab. 3.8: Material und Lösungen für die Annexin V-FITC- und PI-Färbung

### 3.7.2 Messung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ )

Durch die Bestimmung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) lässt sich die Vitalität der Mitochondrien bestimmen. Zu einem Abfall des Potentials kommt es durch Öffnen der mitochondrialen Permeabilitätsporen, was wiederum zu einem kompletten Ausfall der Atmungskette führt. Eine Veränderung bzw. der Verlust des mitochondrialen Potentials wird außerdem als ein frühes Anzeichen der Apoptose beschrieben.

Der Test wird mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamine Ethylester (TMRE) durchgeführt, der ( $\Delta\Psi_m$ )- sensitiv ist. TMRE ist ein Farbstoff, der sich an die intakte negativ geladene innere Mitochondrienmembran anlagert. Eine Verminderung des Membranpotentials führt zu einer Abschwächung der Fluoreszenz. Die Ermittlung und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte per Durchflusszytometrie bei einer Anregung von 488 nm und einer Detektion der Rotfluoreszenz in Kanal FL-2 (575 nm). Je Probe wurden 10.000 Ereignisse gezählt.

TMRE färbt im niedermolekularen Bereich ausschließlich Mitochondrien und wird beim Kollaps des mitochondrialen Gradienten nicht in der Zelle zurück gehalten. Als Positivkontrolle wird die Chemikalie Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) eingesetzt, die einen maximalen Verlust des Membranpotentials induziert, indem sie die oxidative Phosphorylierung entkoppelt und dadurch den mitochondrialen Protonengradienten eliminiert (siehe Abb. 3.6). Nach dieser Färbemethode können verschiedene Stadien des Mitochondrialen Membranpotentials unterschieden werden und im Dot Blot dargestellt werden (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Dot Blot Analyse von A549 Zellen nach TMRE-Färbung**

(A) Die unbehandelte Kontrolle zeigt eine starke Rotfluoreszenz, was auf ein intaktes mitochondriales Membran Potential hindeutet. (B) Die mit FCCP (20 µM) behandelte Positivkontrolle weist nur eine schwache Fluoreszenz auf. Das Mitochondriale Membran Potential ist weitgehend gestört (Vergrößerung: 400x).

Für die Durchführung der TMRE-Färbung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro well einer 6-well Platte ausgesät und 24h lang zum Anwachsen in den Brutschrank gestellt. Anschließend erfolgte die Partikelinkubation mit den entsprechenden Verdünnungen. Eine Stunde vor

Ablauf der Inkubation wurde 20  $\mu\text{M}$  Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) als Positivkontrolle zu einer Probe gegeben. Eine halbe Stunde vor Ablauf der Inkubation wurden alle Proben mit 0,5  $\mu\text{M}$  TMRE gefärbt. Nach Ablauf der gesamten Inkubationszeit wurden die Zellen auf Eis geerntet, mit PBS gewaschen und schließlich am Durchflusszytometer gemessen.

- 10 mM (in Ethanol) Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- 1 mM (in DMSO) Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE), Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Durchflusszytometer Flow Cytometer BD LSR II (FACS), Becton Dickinson, Heidelberg
- Fluoreszenzmikroskop DM IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar
- Improvison Volocity 4, Grid Convocal, Improvison, Coventry England

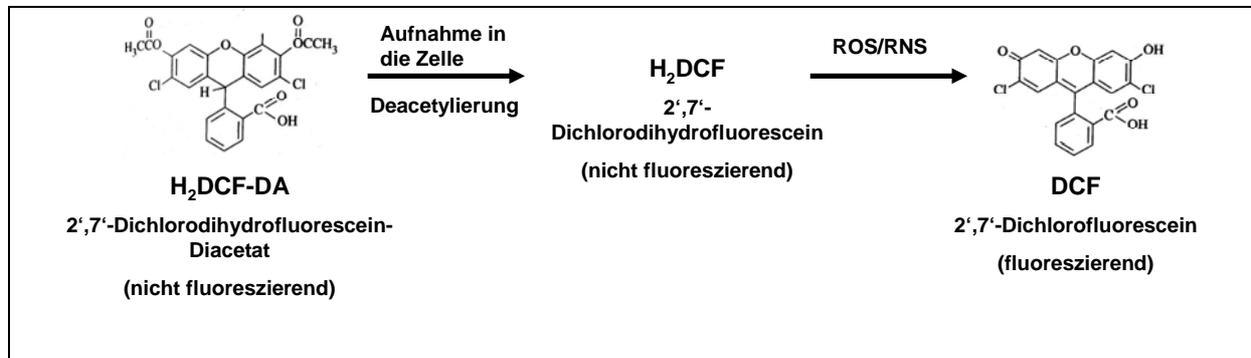
Tab. 3.9: Material und Lösungen für die TMRE-Färbung

### **3.8 Messung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies (ROS/RNS)**

#### **3.8.1 DCF-Test**

Der Nachweis von allgemeinen, unspezifischen intrazellulären reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS), die zu Oxidativem Stress führen können, erfolgte z.B. mithilfe des DCF-Tests. Hierbei kommt es zur Umwandlung des nicht-fluoreszierenden Farbstoffes 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein-fluoreszent (DCF) (Wan et al., 1993). Das  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  ist zellpermeabel und wird durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert, so dass der Farbstoff in der Zelle verbleibt. In Gegenwart von ROS/RNS, wie z.B. Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{O}_2^-$  oder  $\text{ONOO}^-$  wird der Farbstoff in das fluoreszierende DCF umgewandelt, welches im Fluoreszenzreader nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Der DCF-Test ist somit keine Methode zur Messung von spezifischen reaktiven Spezies.

Der DCF-Test stößt allerdings auch an seine Grenzen, wenn es um die Frage der Genauigkeit und Zuverlässigkeit geht. Ein wichtiger Kritikpunkt ist zum einen, dass das Superoxidanion Radikal  $\bullet\text{O}_2^-$  nicht verlässlich mit diesem Test nachgewiesen werden kann, da dieses Radikal auch während der Umwandlung von  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  zu DCF entsteht. Die Disproportionierung von  $\bullet\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  welche in Anwesenheit von Peroxidasen wiederum mehr  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  zu DCF umwandelt, führt somit zu einer Selbstampfifikation des Testsystems. So erscheint auch der Nachweis von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit dem DCF-Test fragwürdig (Bonini et al., 2006; Rota et al., 1999). Aufgrund dieser Kritikpunkte wurden die Ergebnisse aus dem DCF-Test mit weiteren Testsystemen (DHR123, DHE) wiederholt und abgesichert.



**Abb. 3.7: Reaktion der Umwandlung von  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  zu DCF durch ROS/RNS**  
(Quelle: verändert nach: <http://probes.invitrogen.com>)

Für die Durchführung des Tests wurden 25.000 Zellen pro well in eine 96-well Platte ausgesät und über Nacht zum Anwachsen in den Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) gestellt. Nach Zugabe der entsprechenden Partikelsuspensionen und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte zentrifugiert (350xg, 5 Minuten) und der Zellrasen anschließend gründlich mit HBSS gewaschen, damit möglichst wenige Partikel das Fluoreszenzsignal stören können. Als Positivkontrolle wurde eine einstündige Behandlung der Zellen mit  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet. Zur Untersuchung des Effektes von N-acetyl-L-cysteine (NAC), einem Anti-Oxidanz, wurden die Zellen mit  $10 \text{ mM}$  NAC für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit der Partikelsuspension, die ebenfalls die gleiche Menge NAC enthielt.

Dann erfolgte die Zugabe von  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  zu den Zellen, welche für 40 Minuten im Brutschrank mit dem Farbstoff inkubiert wurden. Vor der Messung am Fluoreszenzreader wurde der Zellrasen zweimal mit HBSS gewaschen. Die Anregung im Fluoreszenzreader erfolgte bei  $488 \text{ nm}$  und einer Emission bei  $530 \text{ nm}$ .

- 5 mM (in DMSO) 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA), Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Merck KGaA, Darmstadt
- N-acetyl-L-cysteine (NAC), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Fluoreszenzreader, MWG-Biotech AG, Ebersberg
- Software: Lambda KC4 2.7

Tab. 3.10: Material und Lösungen für den DCF-Test

### 3.8.2 DHR123-Test

Der DHR123-Test ist ebenso wie der DCF-Test eine Methode, um die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies zu messen, indem die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Rhodamine123 gemessen wird. Der zellpermeable nicht-fluoreszierende Farbstoff Dihydrorhodamine123 (DHR123) wird von Zellen aufgenommen und durch Radikale zum fluoreszierenden Rhodamine123 oxidiert, der sich hauptsächlich in den Mitochondrien einlagert. Die Reaktion der beiden reaktiven Spezies  $\bullet\text{O}_2^-$  und  $\text{NO}\bullet$  zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) kann auf diese Weise detektiert werden. Allerdings ist dieser Test nicht ausschließlich für den Nachweis von  $\text{ONOO}^-$  und  $\bullet\text{O}_2^-$  anwendbar, da andere reaktive Spezies, wie z.B. Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und HOCl ebenfalls DHR123 oxidieren können.

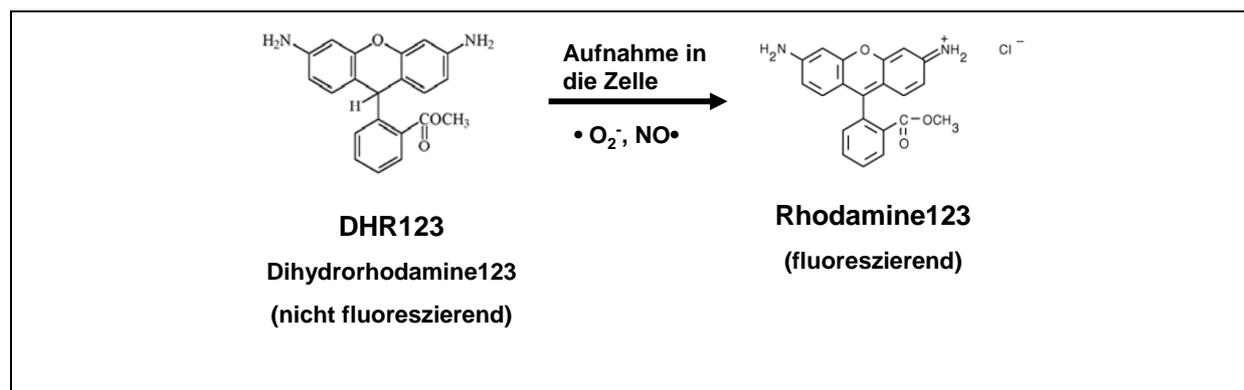


Abb. 3.8: Reaktion von DHR123 zum fluoreszierenden Rhodamine123 durch Radikale (verändert nach: Quelle: <http://probes.invitrogen.com>)

Die Durchführung des DHR123-Tests wurde gemäß der Vorschrift für den DCF-Test (siehe Kapitel 3.8.1) mit 10  $\mu\text{M}$  DHR123 durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine einstündige Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  3-Morpholinosydnonimine hydrochloride

(SIN-1). SIN-1 zerfällt in wässriger Lösung spontan zu  $\text{NO}\cdot$  und  $\cdot\text{O}_2^-$ , die zu  $\text{ONOO}^-$  reagieren.

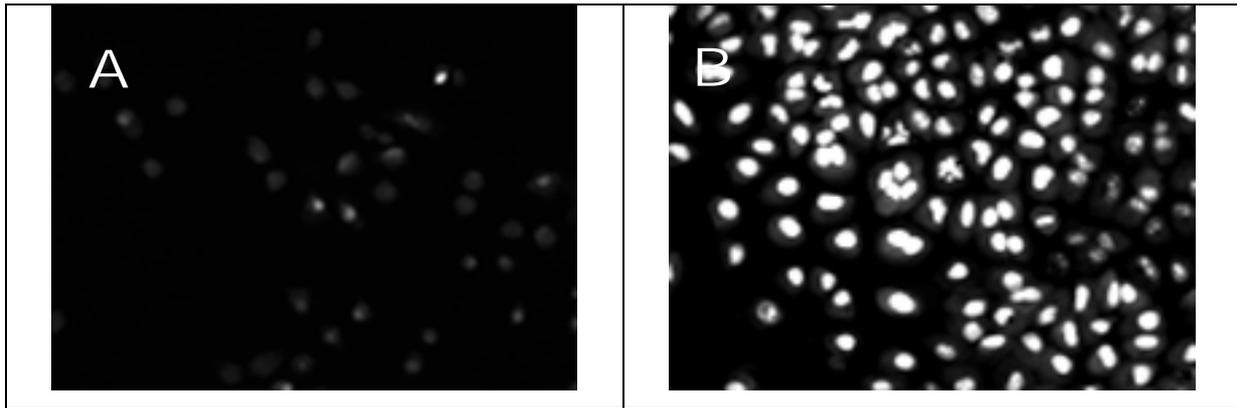
- 10 mM (in DMSO) Dihydrorhodamine123 (DHR123), Molecular Probes Inc., Leiden Niederlande
- 3-Morpholinosydnimine hydrochloride (SIN-1), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Fluoreszenzreader, MWG-Biotech AG, Ebersberg
- Software: Lambda KC4 2.7

**Tab. 3.11: Material und Lösungen für den DHR123-Test**

### **3.8.3 Bestimmung von ROS mit Dihydroethidium (DHE)-Färbung**

Eine weitere Methode zur Bestimmung von intrazellulären reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies ist die Färbung mit Dihydroethidium (DHE). DHE ist eine zellpermeable Substanz, die mit  $\cdot\text{O}_2^-$  zu Ethidium reagiert, welches im Zellkern mit der DNA interkaliert. Bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm kann die Fluoreszenz im Zellkern dargestellt werden. DHE ist relativ spezifisch für  $\cdot\text{O}_2^-$ , kann aber auch mit  $\cdot\text{OH}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagieren (Munzel et al., 2002).

Die Durchführung des DHE-Tests erfolgte in 2er chamber slides (4,3 cm<sup>2</sup>). Pro chamber wurden  $2 \times 10^5$  Zellen ausgesät und über Nacht in den Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Partikelverdünnungen. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 10 µM DHE im Brutschrank inkubiert. Für die Bestimmung der Fluoreszenz wurden die gewaschenen Proben direkt im Anschluss an die DHE-Inkubation mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm ausgewertet und optisch dargestellt. Als Positivkontrolle diente in diesem Test eine einstündige Behandlung der Zellen mit 1 µM 3-Morpholinosydnimine hydrochloride (SIN-1) (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A549 Zellen nach DHE-Färbung**

(A) Die unbehandelte Kontrolle zeigt nur ein schwaches Fluoreszenzsignal, was auf eine geringe ROS/RNS-Bildung hindeutet. (B) Die mit SIN-1 (1  $\mu$ M) behandelte Positivkontrolle weist hingegen eine sehr starke Fluoreszenz auf. Eine große Menge von ROS/RNS ist freigesetzt worden (Vergrößerung: 200x).

- 5 mM Dihydroethidium (DHE) (in DMSO), Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 3-Morpholinosydnimine hydrochloride (SIN-1), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Lab-Tek® Chambered #1 Borosilicate Coverglass System, Nunc, Rochester, NY, U.S.A
- Fluoreszenzmikroskop DM IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar
- Improvison Volocity 4, Grid Convocal, Improvison, Coventry England

**Tab. 3.12: Material und Lösungen für die DHE-Färbung**

### 3.9 Zellproliferations-Messung mittels ELISA (BrdU)

Lebende (proliferierende) Zellen zeichnen sich unter anderem durch DNA-Synthese, die während der S-Phase, der Mitose (Zellteilung), stattfindet aus. Der BrdU-Test ist ein kolorimetrischer *in vitro* Proliferations-Test, der auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in die neusynthetisierte DNA proliferierender Zellen beruht. Dadurch können proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Die DNA wird in diesem Test durch das Reagenz FixDenat denaturiert und ermöglicht somit das Angreifen der Testsystem-Antikörper, die das inkorporierte BrdU detektieren sollen. Durch Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers, der den primären Antikörper gegen BrdU darstellt, entsteht ein Immunkomplex. Das anschließend zugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) wird durch die an den BrdU-Anti-BrdU-Komplex konjugierte Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, dessen

Farbe durch die anschließend zugegebene Schwefelsäure nach gelb umschlägt. Die photometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm). Die entstehende Farbintensität korreliert mit der Anzahl proliferierender Zellen. Je höher der Grad der Zellproliferation ist, desto höher ist auch die Menge an inkorporiertem BrdU in der neu synthetisierten DNA.

Für die Durchführung des Tests wurden 25.000 Zellen pro well einer 96-well Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht zum Anwachsen in den Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Anschließend wurde die Partikelsuspension in den entsprechenden Verdünnungen zu den Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe der BrdU-Lösung und die einzelnen Wasch- und Färbeschritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers und wurden entsprechend durchgeführt. Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte im Absorptionsreader bei 450 nm.

- Cell Proliferation ELISA, BrdU (coloimetric), Roche Applied Science, Mannheim

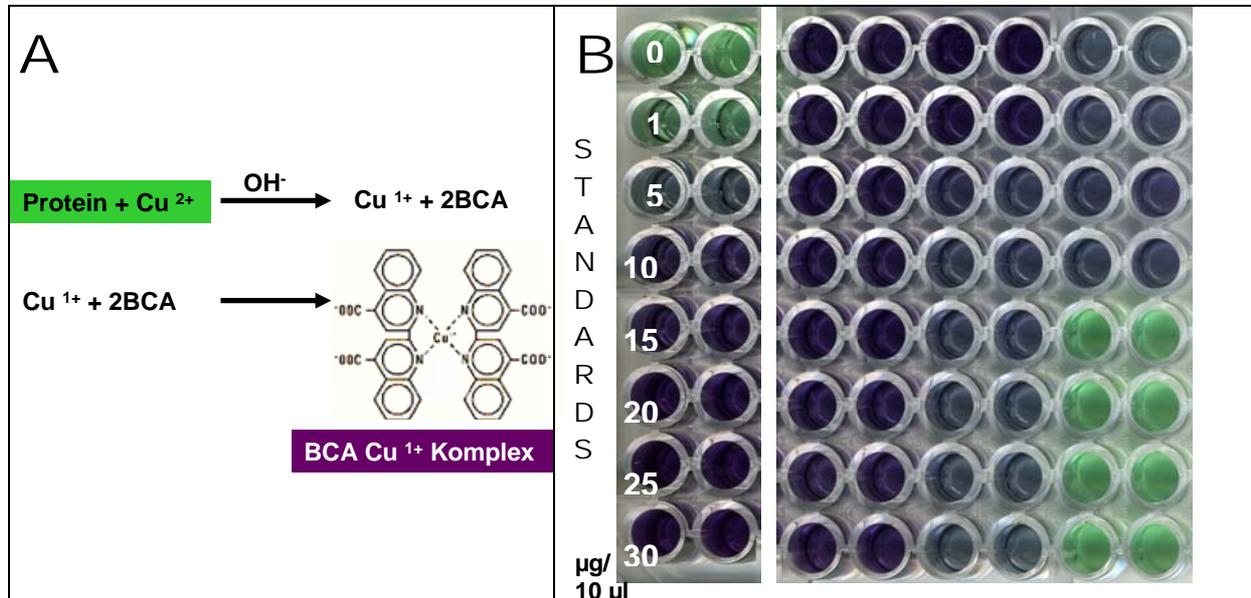
**Tab. 3.13: Material und Lösungen für den BrdU-Test**

## **3.10 Proteinanalytik**

### **3.10.1 Proteinbestimmung**

Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA) nach der Methode von Smith et al. (1985) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Komplexbildung von Proteinen mit Cu<sup>2+</sup>- Ionen in alkalischer Lösung. Es erfolgt eine Reduktion der Cu<sup>2+</sup>- Ionen, welche mit dem BCA Reagenz einen violetten Farbkomplex bilden (Abb. 3.10). Dieser Farbumschlag kann schließlich im Absorptionsreader bei 562 nm gemessen werden. Für diese Messung benötigt man jedoch außerdem eine Standard-Eichkurve mit genau definierten Proteinlösungen von Rinderserum-Albumin (BSA) in PBS mit aufsteigenden Konzentrationen (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/10 µl). Jeweils 10 µl werden in Doppel-Bestimmung in eine 96-well Platte pipettiert. Zusätzlich wurden 2 µl der zu messenden Probe auf die Platte gegeben. Das BCA Reagenz wurde angesetzt, indem 50 Teile BCA-Lösung mit einem Teil 4%-iger CuSO<sub>4</sub> Lösung gemischt wurden. Von dieser Lösung wurden 200 µl in jedes well zugegeben und die Platte anschließend für 30 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Nach Ablauf der

Inkubation und kurzer Abkühlung wurden die Proben im Absorptionsreader gemessen, mit Werten der Eichkurve ins Verhältnis gesetzt und ausgewertet. Die wasserlöslichen violetten Farbkomplexe verhalten sich linear zur Proteinmenge in der Probe. Je dunkler die Farbe der Lösung, desto mehr Protein ist enthalten.



**Abb. 3.10: Reaktion der BCA-Proteinmengenbestimmung**

(A) Bei der Proteinbestimmung mit BCA entstehen wasserlösliche Farbkomplexe aus der Reaktion von Protein mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung und den reduzierten  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen mit BCA. (B) Die Eichkurve wird mittels Standarddeichproben (Standards) bestimmt, die jeweils eine definierte Menge an Protein (BSA) enthalten. Die Bildung der violetten Farbkomplexe verhält sich linear zur Proteinmenge. Je dunkler die Lösung, desto mehr Protein ist enthalten (Quelle: verändert nach: www.Piercenet.com).

### 3.10.2 Herstellung von Ganzzellextrakten

Nach Beendigung der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen, um Partikelreste zu entfernen und anschließend entweder mit Trypsin/EDTA abtrypsiniert oder mit einem Plastikschaber (Nunc, Rochester, NY, U.S.A) vorsichtig abgeschabt. Es folgte ein weiterer Waschschrift, indem die Zellen abzentrifugiert (350xg, 5 Minuten) und anschließend in 50 µl Lysispuffer (RIPA-Puffer) mit Zusätzen (siehe Tab. 3.14) für 30 Minuten auf Eis lysiert wurden. Nach Ablauf der Lyse wurden die Proben zentrifugiert (21.000xg, 10 Minuten) und der Überstand mit den Ganzzellextrakten vorsichtig abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.10.3 Herstellung von Kernextraktionen

Die Zellen für die Kernextraktion wurden wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben geerntet und das Pellet in 100 µl hypotonem Lysispuffer A mit Zusätzen (siehe Tab. 3.14) resuspendiert, was dazu führt, dass die Zellen anschwellen. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis konnten die Zellen mit 0,3% NP40 aufgebrochen werden, indem zusätzlich die Proben kräftig für mindestens 1 Minute gevortext wurden. Die Cytoplasma-Fraktion konnte nun von den Kernen durch Zentrifugation (8.500xg, 5 Minuten, 4°C) getrennt werden und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Das Pellet mit den Zellkernen wurde vorsichtig mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert (8.500xg, 5 Minuten, 4°C). Das Pellet mit den intakten Kernen konnte an dieser Stelle bei -20°C über Nacht eingefroren werden, um ein besseres Aufbrechen der Kerne zu gewährleisten. Die Lyse der Kerne erfolgte mit 50 µl RIPA-Puffer mit Zusätzen (Tab. 3.14) auf Eis, bis das Pellet gelöst war. Die gelösten Kernproteine wurden anschließend mittels Zentrifugation (13.000xg, 5 Minuten, 4°C) von den Zellbruchstücken getrennt, der Überstand vorsichtig abgenommen und bei -20°C eingefroren. Der Nachweis von Lamin B, ein Intermediärfilamentprotein des Kerns, diente in den Versuchen zur Überprüfung der sauberen Trennung der Kern- und Cytoplasmaproteine. Hierbei wurde sichergestellt, dass in der cytosolischen Fraktion kein Lamin B nachzuweisen war.

Entsprechend den Ergebnissen aus der Proteinbestimmung wurden je 20 µg Protein in 1x Lämmli-Puffer mit RIPA-Puffer (1:1) (Tab. 3.14) aufgenommen und für die weitere Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) (siehe Kapitel 3.10.4) vorbereitet.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Lysispuffer A (hypotoner Puffer pH 7,9):</u></li> <li>- 10 mM HEPES</li> <li>- 10 mM KCl</li> <li>- 0,1 mM EDTA</li> <li>- 0,1 mM EGTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>RIPA-Puffer (denaturierender Lysepuffer):</u></li> <li>- 150 mM NaCl</li> <li>- 20 mM Tris-HCl, pH 7,4</li> <li>- 0,5% Deoxycholate, Na-Salz</li> <li>- 0,1% SDS</li> <li>- 1% Triton-X 100</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Zusätze auf 1ml:</u></li> <li>- 5 µl 1 mM DTT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% NP40</li> <li>• <u>4x Lämmli:</u></li> </ul>

- 5 µl 0,5 mM PMSF	- 160 mM Tris/HCl (pH 6,8)
- 2 µl 2 µg/ml Leupeptin	- 4% SDS
- 2 µl 2 µg/ml Aprotinin	- 22,8% Glycerol
- 1 µl 100mM Na-Vanadat	- 4% 2-Mercaptoethanol
	- 0,08% Bromphenolblau

**Tab. 3.14: Material und Lösungen für die Proteinextraktion**

### 3.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gel-Elektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen und ermöglicht eine schnelle Bestimmung von Molekulargewichten (Laemmli, 1970). Voraussetzung für eine Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht ist deren Denaturierung durch die Zugabe von anionischen Detergenzien, wie etwa Sodiumdodecylsulfat (SDS). SDS verhindert Protein-Protein Wechselwirkungen und bildet negativ geladene SDS-Protein Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Die Komplexe der verschiedenen Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der SDS-Elektrophorese wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode (Pluspol). Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer Polyacrylamid-Matrix die SDS-Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf.

Zur Auftrennung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurde stets ein 5%-iges Sammelgel und ein 10%-iges Trenngel verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde eine Acrylamid-Fertiglösung verwendet, welche neben 30% Acrylamid bereits mit 0,8% Bisacrylamid versetzt ist. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden gemäß folgender Tabelle (Tab. 3.15) für 2,5 ml Sammelgel und 5 ml Trenngel angesetzt. Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurde Tetramethylethidium (TEMED) zum Start der Polymerisation zugegeben.

	<b>Sammelgel (5%)</b>	<b>Trenngel (10%)</b>
Rotiphorese® Gel 30	-	1,65 ml
Sammelgel	2,5 ml	-
1,5 M Tris	-	1,25 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	-	2,0 ml

20% SDS	-	25 µl
10% APS	25 µl	50 µl
TEMED	3,75 µl	5 µl

**Tab. 3.15: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels**

Zunächst wurde das Trenngel in einer vertikalen Apparatur (BioRad, München) mit 0,75 mm Spacern gegossen und zum Vermeiden von Blasenbildung sowie zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Oberfläche sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol verworfen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und mit einem Probenkamm versehen. Nach erneuter vollständiger Polymerisation konnte der Kamm entfernt und die Gele in die Apparatur eingespannt werden. Nun konnten die Gele mit den vorbereiteten Proben beladen werden. Als Molekularmarker wurde der PageRuler von Fermentas GmbH verwendet. Die Apparatur wurde schließlich mit Laufpuffer gefüllt und an eine Stromquelle mit 170 V angeschlossen. Nach ca. 60 Minuten erreichte die Laufmittelfront das Ende des Gels und der Lauf konnte gestoppt werden.

- Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Sammelgel (in H<sub>2</sub>O bidest.):
  - 30% Acrylamidmix
  - 2 M Tris-HCl, pH 6,8
  - 20% SDS
- Laufpuffer (in H<sub>2</sub>O bidest.):
  - 25 mM Tris-Base
  - 1,2 mM Glycin
  - 1% SDS
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH Life Sciences, St. Leon-Rot
- Electrophoresis PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

**Tab. 3.16: Material und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Elektrophorese**

### 3.10.5 *Das Blotten*

Beim Blotten werden die Proteine des SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen, um spezifische Proteine durch Immunfärbung sichtbar zu machen (Gultekin and Heermann, 1988; Towbin et al., 1992). Zunächst wurde die Membran mit Methanol gespült, um Verunreinigungen zu beseitigen und die Proteinbindungsstellen zu aktivieren. Anschließend erfolgte ein kurzer Waschschrift in destilliertem Wasser. Daraufhin wurde die Membran luftblasenfrei mit dem Gel in eine Blot-Halterungskassette eingespannt und in die Blot-Kammer überführt. Das Blotten geschieht in einem speziellen Puffer, welcher 10% Methanol enthält, um die Aktivierung der Bindungsstellen zu sichern. Zur Gewährleistung eines problemlosen Blotvorgangs ist darauf zu achten, dass das Gel in Richtung Kathode und die Membran in Richtung Anode vorliegt, da sonst die negativ geladenen Proteine nicht auf die Membran übertragen werden. Durch die Zugabe eines Kühllakkus sowie durch ständiges Rühren wird eine Erwärmung der Apparatur vermieden. Das Blotten dauerte ca. 1 Stunde bei einer Stromstärke von 100 V.

- Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran, 0,45 µm Porengröße, Millipore GmbH, Schwalbach
- Blotpuffer (in H<sub>2</sub>O bidest.):
  - 25 mM Tris-Base
  - 192 mM Glycin
  - 10% Methanol (v/v)
- Electrophoresis PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Tab. 3.17: Material und Lösungen für das Blotten

### 3.10.6 *Immunologischer Nachweis von Proteinen*

Nach erfolgter Übertragung der Proteine auf die PVDF Membran wurde diese für 5 Minuten mit PBS/T (PBS mit 0,1% Tween-20, v/v) bzw. TBS/T bei Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern gewaschen, um das Methanol zu entfernen. Anschließend erfolgte für 1 Stunde das Blocken der Membran mit 5% Magermilch in PBS/T bzw. TBS/T bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Daraufhin wurde die Membran 3x für jeweils 10 Minuten mit PBS/T bzw. TBS/T

gewaschen und mit den entsprechenden in Tab. 3.18 aufgelisteten Antikörpern in 3% BSA in PBS/T bzw. TBS/T über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte wiederum ein 3-maliges Waschen der Membran mit PBS/T bzw. TBS/T für jeweils 10 Minuten, um unspezifisch bindende Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde schließlich mit dem entsprechenden sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper ebenfalls in 3% BSA inkubiert.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
<b>PRIMÄR</b>		
➤ anti-FAK (C-20)	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
➤ anti-Lamin B (M20)	1 : 2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
➤ anti-MyD88 (C-Terminal)	1 : 200	SIGMA- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
➤ anti-NFκB p65 (A)	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
➤ anti-PCNA	1 : 6000	Santa Cruz Biotechnology Inc, U.S.A
➤ anti-p-FAK (Tyr 397)	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
➤ anti-TLR4 (H-80)	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
➤ anti-Vinculin (H-10)	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
<b>SEKUNDÄR</b>		
➤ anti-Goat-HRP	1 : 3000	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
➤ anti-Mouse-HRP	1 : 6000	Dako, Glostrup, Denmark
➤ anti-Rabbit-HRP	1 : 3000	Amersham Biosciences, München

**Tab. 3.18:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für die Proteinanalytik (Western Blot)

Nach anschließendem 3-maligem Waschen der Membran erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels „*Enhanced Chemiluminescence*“ (ECL Plus™). Die an die sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase, katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus. Das entstehende Licht wird über einen Film detektiert. Nach Anleitung wurde Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 40:1 miteinander vermischt, für 4 Minuten auf die Membran gegeben und im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und in eine Filmkassette überführt. Die anschließende Detektion erfolgte in einer Dunkelkammer mit einem speziellen Film, welcher durch die entstehende Lumineszenz belichtet wird. Die Belichtungszeit hängt von der Menge des vorhandenen Proteins und der Menge des HRP-gekoppelten Antikörpers

ab. Sie muss während der Entwicklung individuell bestimmt werden. Die belichteten Filme wurden zunächst in einem Entwicklungsbad eingelegt, bis die Banden sichtbar wurden und anschließend in Leitungswasser gewaschen. Daraufhin wurden die Filme im Fixierbad fixiert, mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet, zum Auswerten eingescannt und die Bandenintensität mit der Software Odyssey 2.0 ausgewertet.

- 10xTBS (in 1 l H<sub>2</sub>O bidest.):
  - 80 g NaCl
  - 24,2 g Tris-Base
- ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences, München
- Hyperfilm™-ECL, Amersham Biosciences, München
- Developer/replenisher, G150, AGFA, Köln (1:5 in H<sub>2</sub>O bidest.)
- Superfix, Tetenal Photowerk, Norderstedt (1:7 in H<sub>2</sub>O bidest)
- Software: Odyssey 2.0

Tab. 3.19: Material und Lösungen für den immunologischen Nachweis von Proteinen

### 3.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

#### 3.11.1 Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist ein mikroskopisches Verfahren zur Darstellung von Proteinen im subzellulären Bereich, das auf der Immunfluoreszenz-Technik basiert.

Für die Durchführung dieses Verfahrens wurden  $2 \times 10^5$  Zellen zunächst in 2er chamber slides ( $4,3 \text{ cm}^2$ ) ausgesät und über Nacht im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) ruhen gelassen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Partikeln in den jeweiligen Konzentrationen. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen fixiert, indem der Zellrasen zunächst mit kaltem PBS gewaschen wurde, um Partikelreste zu entfernen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Des Weiteren mussten die Zellen permeabilisiert werden, damit die eingesetzten primären Antikörper in die subzellulären Bereiche der Zelle eindringen und sich spezifisch anlagern können. Hierfür wurde eine PBS/Triton-X 100 Lösung verwendet und die Zellen dreimal für 5 Minuten unter ständiger Bewegung gewaschen. Schließlich erfolgte das Blockieren mit 3% BSA bzw.

5% polyklonalem Rabbit/Mouse Serum in PBS/Triton-X 100 für eine Stunde bei Raumtemperatur, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu vermeiden. Bevor der primäre Antikörper (siehe Tab. 3.20) über Nacht (4°C) zugegeben wurde, mussten die Zellen nochmals mit PBS/Triton-X 100 dreimalig für jeweils 5 Minuten gewaschen werden. Nach Abschluss der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Zellen wiederum dreimalig für jeweils 5 Minuten mit PBS/Triton-X 100 gewaschen, um nicht-gebundene primäre Antikörper zu entfernen. Dann erfolgte die einstündige Inkubation des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörpers (siehe Tab. 3.20) bei Raumtemperatur im Dunkeln, damit die Fluoreszenzeigenschaften nicht verringert werden. Zum Abschluss wurden die Zellen nochmals mit PBS/Triton-X 100 gewaschen und zur Analyse im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>PRIMÄR</b>		
➤ anti-FAK (C-20)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
➤ anti-Vinculin (H-10)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A
<b>SEKUNDÄR</b>		
➤ anti-Rabbit-Alexa 488 nm	1 : 500	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
➤ anti-Mouse-Alexa 488 nm	1 : 500	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

**Tab. 3.20: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz**

### **3.11.2 Anfärben des Aktin-Cytoskeletts mit Rhodamine Phalloidine**

Für das Hervorheben des Aktin-Cytoskeletts wurde eine Färbemethode mittels Rhodamine Phalloidine, dem Gift des Knollenblätterpilzes verwendet. Fluoreszierende Phallotoxine können sich spezifisch an F-Aktin der Zelle anlagern und erlauben so eine Darstellung und Charakterisierung des Aktin-Cytoskeletts.

Für die Durchführung dieser Färbung wurden die Zellen wie in Kapitel 3.11.1 behandelt, und anschließend mit einer 1:30 Verdünnung (in PBS) der Rhodamine Phalloidine Lösung für 2 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der

restliche Farbstoff mit PBS abgewaschen und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Generierung der 3D Analyse erfolgte durch die Aufnahme von z-step Ebenen durch die Zelle in 300 nm Schritten mithilfe des Improvison Volocity 4, Grid Convocal und anschließender Bildbearbeitung mit Improvison Volocity 4.

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Paraformaldehyd (PFA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</li><li>• Polyklonales Rabbit/Mouse Serum, Dako, Glostrup, Denmark</li><li>• PBS/Triton-X 100 (0,1% Triton-X 100)</li><li>• Rhodamine Phalloidine, Invitrogen GmbH, Karlsruhe</li><li>• Lab-Tek® Chambered #1 Borosilicate Coverglass System, Nunc, Rochester, NY, U.S.A</li><li>• Fluoreszenzmikroskop DM IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar</li><li>• Improvison Volocity 4, Grid Convocal, Improvison, Coventry England</li></ul> |
|---|

**Tab. 3.21: Material und Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie**

### **3.12 Statistische Auswertung**

Die experimentell ermittelten Daten wurden jeweils als Mittelwerte  $\pm$  der dazugehörigen Standardabweichungen (S.E.M.) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte bei mindestens drei unabhängigen Experimenten mit dem Student's t-test.

## 4 Ergebnisse

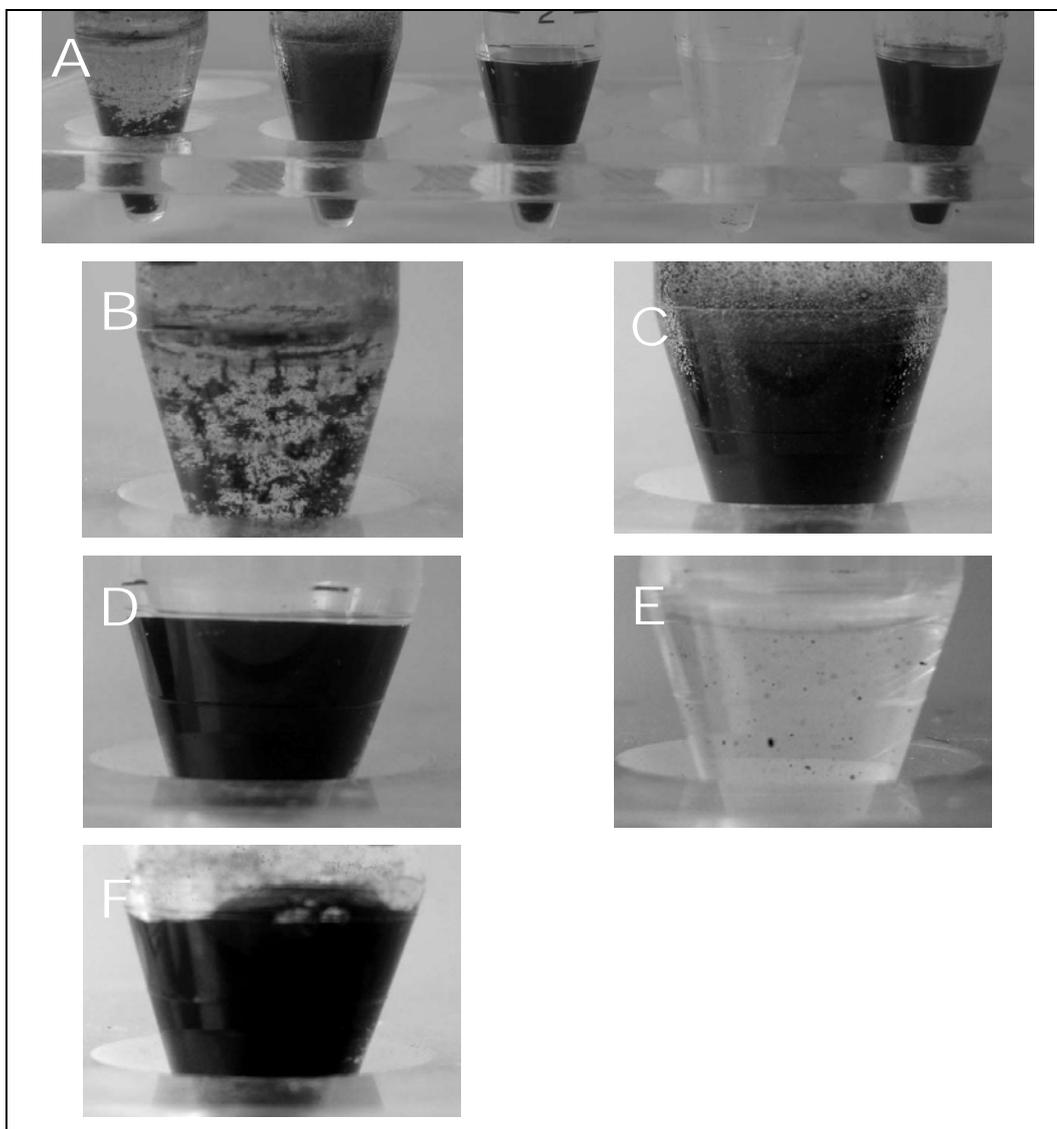
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lungenepithelzelllinie A549 sowie die Endothel-ähnlichen Zellen ECV304 als Zellmodell für eine Exposition mit verschiedenen *Carbon Nanotube* Materialien gewählt und die Ergebnisse mit gut charakterisierten Referenzpartikeln, *Carbon Black* (CB14), verglichen. Die Experimente sollen dazu beitragen, die Risiken für den Menschen bezüglich der Exposition, besonders der Inhalation von synthetisch hergestellten Nanopartikeln, abschätzen zu können und mit bekannten Mechanismen der Partikeltoxizität zu vergleichen.

Zur Charakterisierung der Wirkungsweise von Kohlenstoff Nanoröhren wurde in den ersten Versuchsreihen eine Vielzahl von Studien unternommen, welche eine genaue Beschreibung und optische Analyse der verwendeten Kohlenstoff Nanopartikel liefern und eine potentiell akute Cytotoxizität der Nanotubes auf verschiedene Zellsysteme aufklären sollen.

### 4.1 Charakterisierung der Kohlenstoff Nanoröhren

Für die vorliegende Arbeit wurden kommerziell erworbene (NT-1; Nanostructured & Amorphous Materials Inc., Los Alamos, USA (NT-1 1280YJ-NMG)) einwandige *Carbon Nanotubes* verwendet sowie die im Institut für Nanotechnologie, Forschungszentrum Karlsruhe/ Universität Karlsruhe synthetisierten CNT-Materialien (SWCNT „*as prepared*“ (a.p.), SWCNT „*acid treated*“ (a.t.)) und funktionalisierte SWCNT (fSWCNT). *Carbon Black* (CB14, Printex 90; Ø 14 nm; Degussa AG, CAS-No. 1333-86-4) wurde zusätzlich als gut charakterisiertes Referenzpartikel mit bekannten biologischen Eigenschaften verwendet. Die synthetisch hergestellten Kohlenstoffröhren unterscheiden sich hauptsächlich in der Art und dem prozentualen Anteil ihrer Verunreinigungen (amorpher Kohlenstoff, Übergangsmetalle). Eine genaue Darstellung mit der dazugehörigen chemischen Analyse der verschiedenen hier verwendeten Partikel ist im Kapitel Material & Methoden in Tabelle 3.3 aufgeführt. Zusätzlich zur chemischen Untersuchung wurde das Verhalten der *Carbon Nanotubes* in wässriger Lösung (H<sub>2</sub>O bidest.) nach Ultraschallbehandlung der CNT-Stammlösung beobachtet und beschrieben (Abb. 4.1) sowie die einzelnen Materialien weiterhin im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) genauer charakterisiert (Abb. 4.2).

Die in Abb. 4.1 (A) gezeigte Gesamtaufnahme der verwendeten Partikelsuspensionen zeigt deutliche Unterschiede im Verhalten der Partikel in wässriger Lösung. In Abb. 4.1 (B) sind die stark verunreinigten NT-1 dargestellt, welche große Aggregate, Agglomerate und Micellen bilden, die ohne weitere Vergrößerung gut sichtbar sind und sich schnell, innerhalb weniger Minuten absetzen. Im Gegensatz dazu zeigen die DMF-behandelten (SWCNT a.p.; C) bzw. Säure-aufgereinigten CNTs (SWCNT a.t.; D) deutlich weniger Aggregate. Hier sieht man lediglich eine dunkel gefärbte Suspension, die der CB14-Suspension (F), stark ähnelt. Die funktionalisierten Nanotubes (fSWCNT) in (E) bilden hingegen eine nahezu klare Lösung, in der nur ein paar wenige, große CNT-Bündel sichtbar sind.



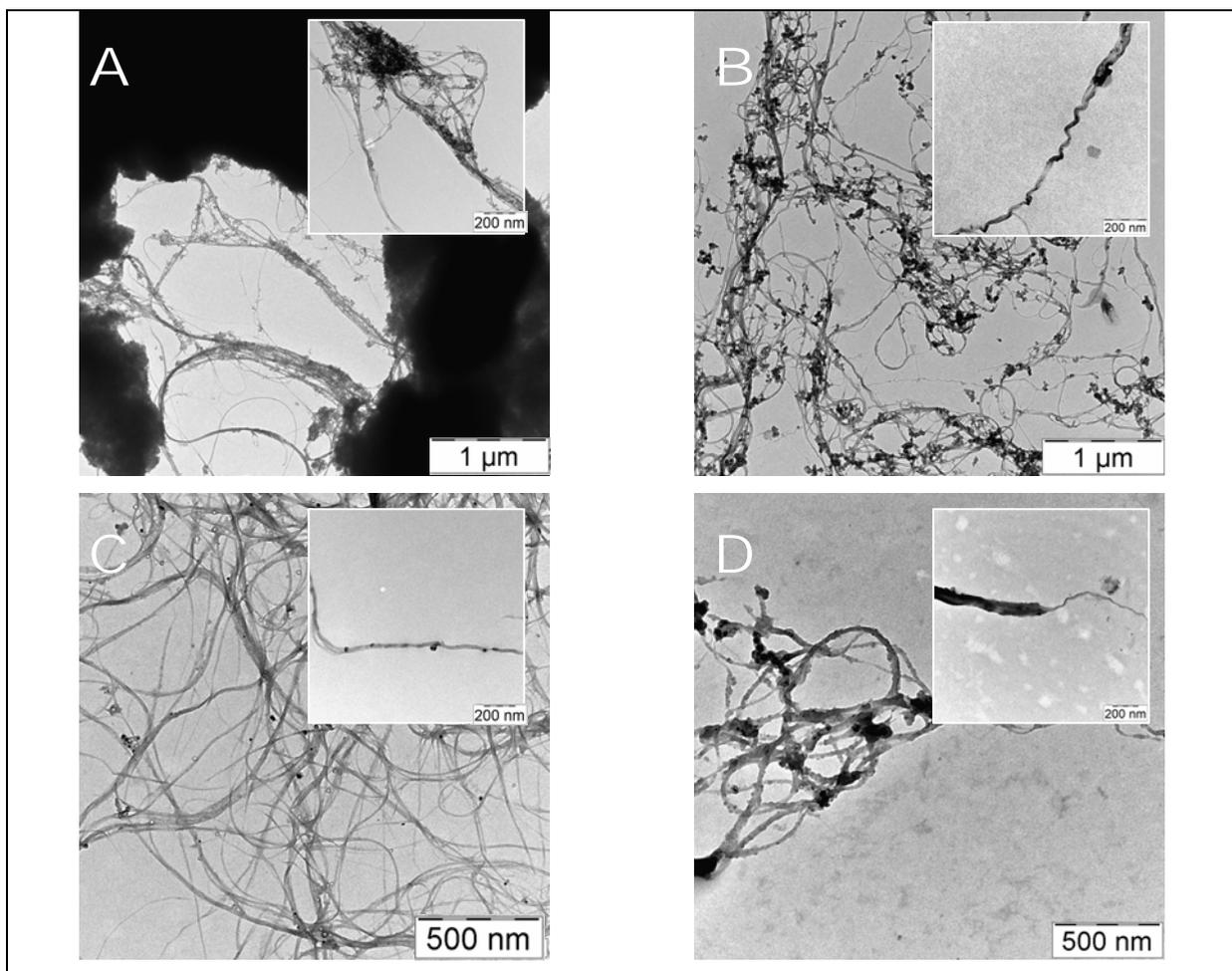
**Abb. 4.1: Suspensierte Carbon Nanotubes zeigen ein unterschiedliches Agglomerationsverhalten nach Ultraschallbehandlung in H<sub>2</sub>O bidest.**

CNT-Materialien wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in wässriger Lösung mit Ultraschall (Duty Cycle 40%, Output Control 4) behandelt und das Suspensionsverhalten der CNTs anschließend mithilfe einer Digitalkamera dokumentiert.

(A) Gesamtaufnahme der verwendeten Partikel (B) NT-1 (C) SWCNT a.p. (D) SWCNT a.t. (E) fSWCNT (F) CB14.

Durch Auftropfen der jeweiligen CNT-Suspensionen auf ein Kupfergrid und anschließendem Trocknen wurden die vorliegenden *Carbon Nanotubes* im TEM genauer untersucht. Hierbei konnten die röhrenartige Form und Größe der verschiedenen Nanotube-Sorten sowie ihre Verunreinigungen deutlich erkannt werden. Auch eine Zusammenlagerung der einzelnen Nanotubes zu großen Aggregaten und Agglomeraten wurde hier klar erkennbar (Abb. 4.2). In diesem Zusammenhang konnten insbesondere Unterschiede der verschiedenen Materialien, hinsichtlich ihrer Verunreinigung und der Tendenz zu aggregieren, beobachtet werden.

Anhand der TEM-Aufnahmen wurden die großen Aggregate der stark verunreinigten NT-1 Nanotubes (A) als schwarze Bündel gut sichtbar, die sich deutlich von den SWCNT a.p. (B) mit ihren alleinigen Metallverunreinigungen, sowie den vollständig aufgereinigten SWCNT a.t. (C) deutlich abhoben. Die Abb. 4.2 (D) zeigt die funktionalisierten SWCNT (fSWCNT) mit einer teilweisen oder vollständigen Beschichtung, erzeugt durch eine Polyacylierung in verschiedenen Säurechloriden mit Nitrobenzol als Lösungsmittel.

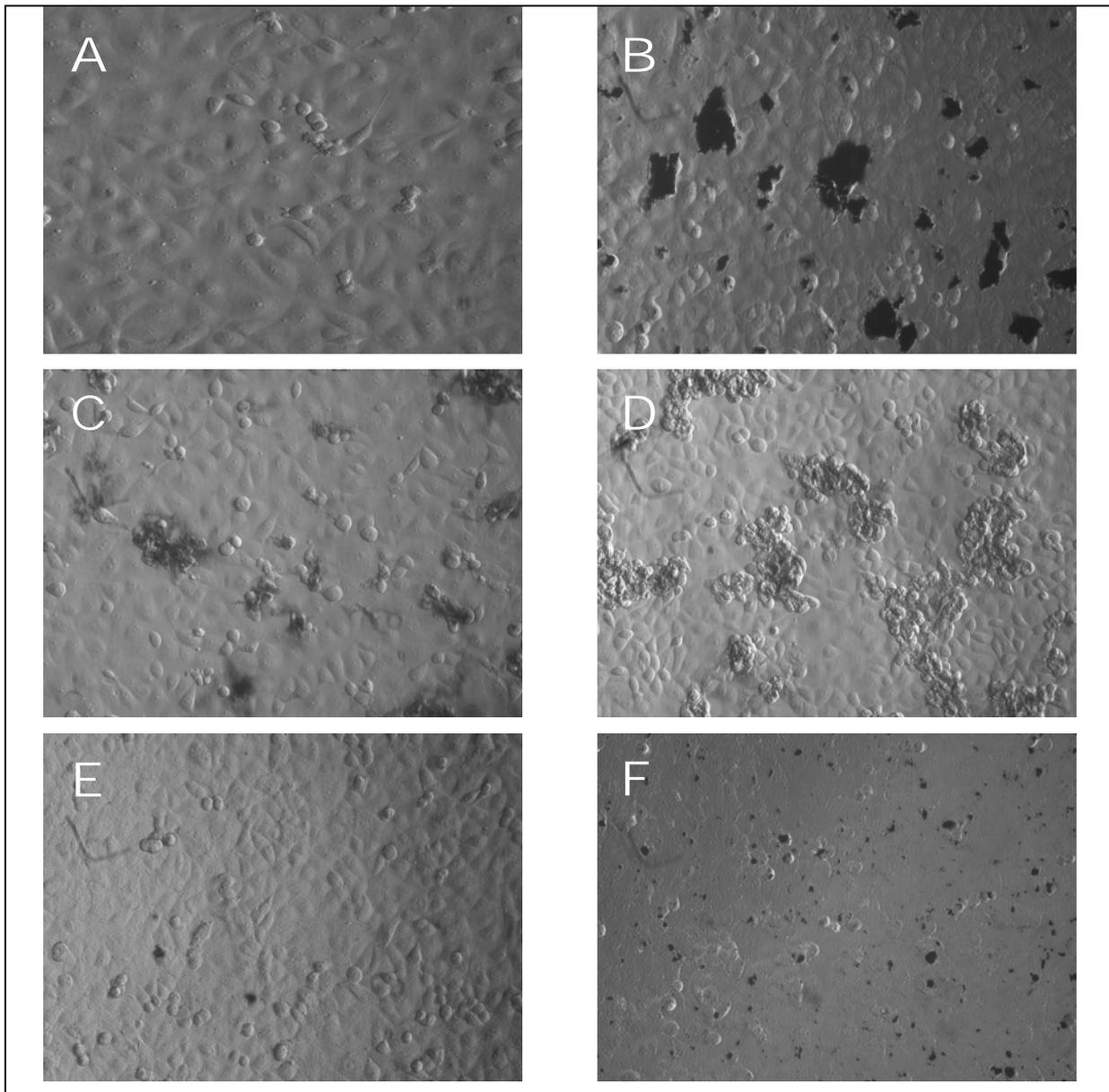


**Abb. 4.2: Transmissionselektronische-Aufnahmen von *Carbon Nanotubes***  
(A) NT-1 (Vergrößerung: 12.000x/ 30.000x) (B) SWCNT a.p. (Vergrößerung: 12.000x/ 30.000x) (C) SWCNT a.t. (Vergrößerung: 20.000x/ 30.000x) (D) fSWCNT (Vergrößerung: 12.000x/ 30.000x).

## **4.2 Zell-Partikel-Interaktion und Aufnahme von Kohlenstoff Nanoröhren in die Zellen**

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die menschliche Lungenepithelzelllinie A549 und die Endothel-ähnlichen ECV304 Zellen eingesetzt, welche die Zielzellen der Lunge repräsentieren sollen. Die Partikelinteraktion in submerser Kultur mit menschlichen Zellen als auch die Partikelaufnahme konnte sowohl im Lichtmikroskop als auch im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) dokumentiert werden. Für die Experimente wurden die *Carbon Nanotubes* jeweils frisch vorbereitet, mit Ultraschall (Sonifier 250, Branson) behandelt (duty cycle 40%, output control 4) und in Zellkulturmedium auf die verschiedenen Endkonzentrationen verdünnt.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.3) demonstrieren, dass Nanotubes sehr gut und eindeutig zu identifizieren waren und tatsächlich mit dem Zellrasen in Kontakt kamen. Auffällig war dabei die Bildung großer CNT-Aggregate, die trotz Ultraschallbehandlung nicht vollständig vereinzelt wurden, als schwarze Bündel gut sichtbar waren und sich deutlich von dem Zellrasen abhoben. Eine weitere charakteristische Besonderheit war die Bildung von ungewöhnlichen Zell-Agglomeraten in Verbindung mit *Carbon Nanotubes*, die besonders nach der Exposition von A549 Zellen mit dem SWCNT a.t. Material ausgeprägt waren (siehe Abb. 4.3 (D)). Diese Formationen konnten weder bei der unbehandelten A549 Kontrolle, noch in fSWCNT- oder CB14-behandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.3 (A, E, F)). Neben den erwähnten CNT-Zell-Agglomeraten wurden jedoch keine weiteren morphologischen Veränderungen der CNT-behandelten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt.



**Abb. 4.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A549 Zellen nach 24h Partikelinkubation ( $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  [ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ])**

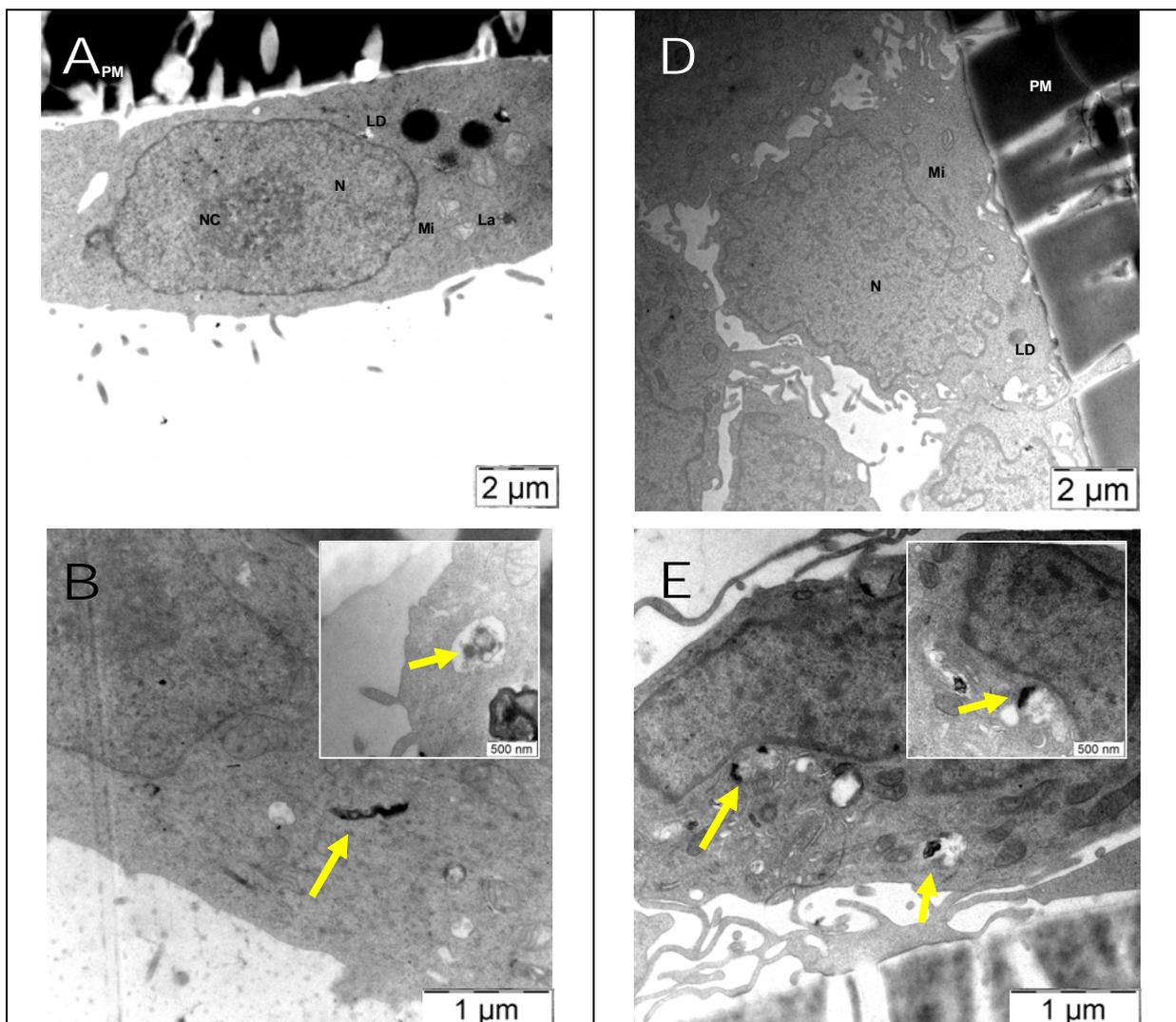
(A) Kontrolle (B) NT-1 (C) SWCNT a.p. (D) SWCNT a.t. (E) fSWCNT (F) CB14 (Vergrößerung 400x).

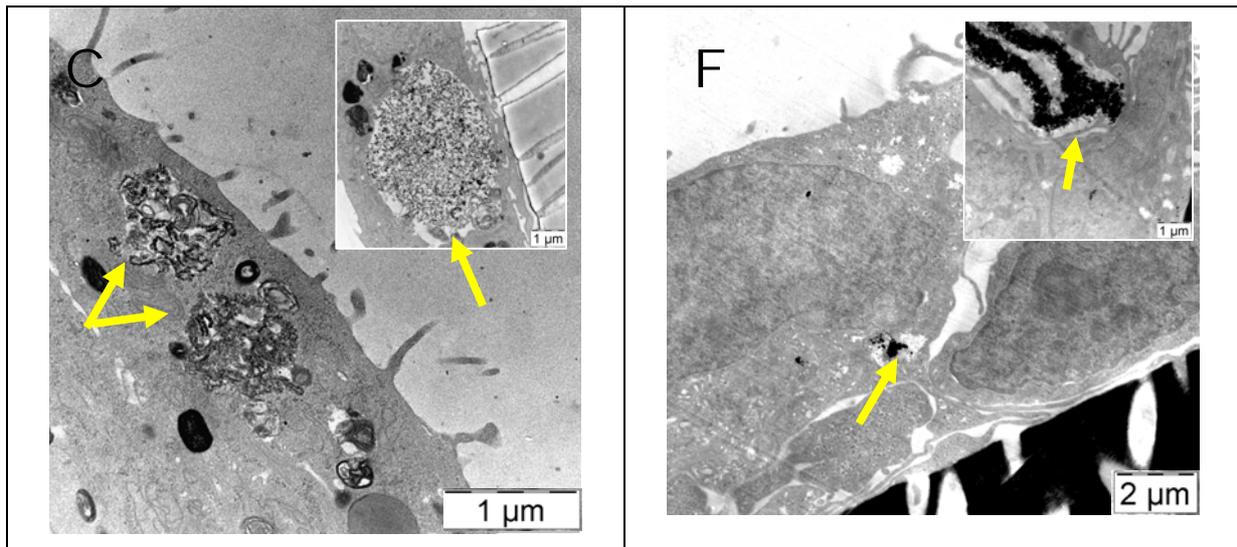
Für eine genauere Beobachtung der intrazellulären Ereignisse nach CNT-Behandlung der Zellen wurden A549 Zellen und ECV304 Zellen auf einer Polycarbonat Membran ausgesät, mit  $68,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) CNTs für einen Zeitraum von 24h behandelt und mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie analysiert.

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop konnten die *Carbon Nanotubes*, die hauptsächlich als größere Aggregate und Bündel zu sehen waren, gut und eindeutig identifiziert werden (gelbe Pfeile) (Abb. 4.4). In den geringen Vergrößerungsstufen waren sie als große Agglomerate, bestehend aus vielen knäuelartig liegenden Nanotubes sichtbar. Erst bei stärkerer Vergrößerung konnten zum Teil auch vereinzelt, eng aneinander liegende Röhren gezeigt werden. Einzelne Nanotubes waren jedoch aufgrund

der begrenzten Auflösung nicht sichtbar. Diese Aufnahmen machen es ebenfalls deutlich, dass sich die Kohlenstoff Nanoröhren trotz Ultraschallbehandlung nur schwer vereinzeln ließen. Andererseits konnte mithilfe der TEM-Aufnahmen gezeigt werden, dass die verwendeten Zellen die Partikel aufgenommen hatten und die CNTs, sowohl frei im Cytoplasma als auch in endolysosomal Zelleinschlüssen, vorzufinden waren. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zeigten die CNT-behandelten Zellen jedoch keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Lediglich die Anzahl der Zellfortsätze und Lamellar-Körperchen (A549) war bei CNT-inkubierten Zellen leicht erhöht.

Die TEM-Bilder ermöglichen die Aussage, ob *Carbon Nanotubes* im submersen *in vitro* Kultursystem lediglich an der Zelloberfläche haften oder auch die Zellmembrangrenze überwinden können und im Cytosol vorzufinden sind, was man bei lichtmikroskopischen Aufnahmen nicht mit Sicherheit sagen konnte. Bei den TEM-Bildern handelt es sich um Momentaufnahmen. Es wurde jedoch versucht, möglichst repräsentative Zellen auszuwählen.





**Abb. 4.4: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahmen von A549 und ECV304 Zellen nach 24h Partikelinkubation mit Carbon Nanotubes (68,4 µg/cm<sup>2</sup> [50 µg/ml])**

Die Zellen wurden 24h auf einer Polycarbonate Membran mit verschiedenen CNT-Suspensionen behandelt, anschließend in Einbettungsmedium aufgenommen, Ultrafeinschnitte angefertigt und am TEM untersucht. Die gelben Pfeile zeigen intrazelluläre CNT Bündel.

(A) unbehandelte A549 Kontrolle (Vergrößerung: 3.000x) (B) A549 + SWCNT a.t. (Vergrößerung: 12.000x/ 20.000x) (C) A549 + fSWCNT (Vergrößerung: 12.000x) (D) unbehandelte ECV304 Kontrolle (Vergrößerung: 3.000x) (E) ECV304 + SWCNT a.p. (Vergrößerung: 12.000x/ 20.000x) (F) ECV304 + NT-1 (Vergrößerung: 3.000x/ 12.000x). N–Nucleus, NC–Nucleolus, Mi–Mitochondrium, La–„Lamellar Bodies“, PM–Polycarbonat Membran, LD–„Lipid Drops“

### 4.3 Akute Toxizität

Um festzustellen, welchen Einfluss Kohlenstoff Nanoröhren auf die Vitalität der Zellen ausüben, wurden verschiedene Vitalitätstests durchgeführt. Der MTT-Test, der die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen misst, weiterhin wurde die LDH-Konzentration im Überstand als Maß für die Membranintegrität verwendet ebenso wie das Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (PI) und schließlich wurde noch der WST-1 Test, der ebenfalls die Aktivität der Mitochondrien überprüft, angewendet.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der Zellvitalität nach *Carbon Nanotube* Exposition sind oft sehr widersprüchlich und lassen Raum für Spekulationen. Während einige eine erhebliche CNT-induzierte akute Cytotoxizität nachweisen (Bottini et al., 2006; Cui et al., 2005; Jia et al., 2005; Magrez et al., 2006; Manna et al., 2005; Sharma et al., 2007; Shvedova et al., 2003; Zhang et al., 2007), berichten andere Arbeitsgruppen wiederum von einem fehlenden akut-cytotoxischen Verhalten der CNTs *in vitro* (Cherukuri et al., 2004; Davoren et al., 2007; Dumortier et al., 2006; Flahaut et al., 2006; Ghibelli et al., 2005; Isobe et al., 2006; Kam and Dai, 2005; MacDonald et al., 2005; Pantarotto et al., 2004; Pensabene et al., 2007).

### 4.3.1 Einfluss von Kohlenstoff Nanoröhren auf die Zellvitalität

Zur Untersuchung der akuten Toxizität von Kohlenstoff Nanoröhren wurden zunächst A549 Zellen für einen Zeitraum von 24 bis 96 Stunden mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit den verschiedenen Nanotube Materialien behandelt und anschließend die Zellvitalität überprüft (Abb.4.5). Zur graphischen Darstellung und für einen besseren Vergleich der Ergebnisse untereinander wurde die Vitalität der unbehandelten Kontrollen gleich 100% gesetzt, die gemessenen Werte im Verhältnis dazu berechnet und als Prozent der Kontrolle dargestellt.

Die Abb.4.5 (A) demonstriert die mitochondriale Vitalität der A549 Zellen nach bis zu 96-stündiger CNT Behandlung, gemessen mit dem MTT-Test. Bei diesem Test handelt es sich um eine kolorimetrische Analyse, der eine Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid, MTT) zu blauen, unlöslichen Formazan-Kristallen durch die mitochondrialen Dehydrogenasen zugrunde liegt. Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Die Aktivität der Dehydrogenasen ist ein Maß für die Vitalität dieser Organellen und dient ebenso zur Bestimmung der Vitalität der Zellen.

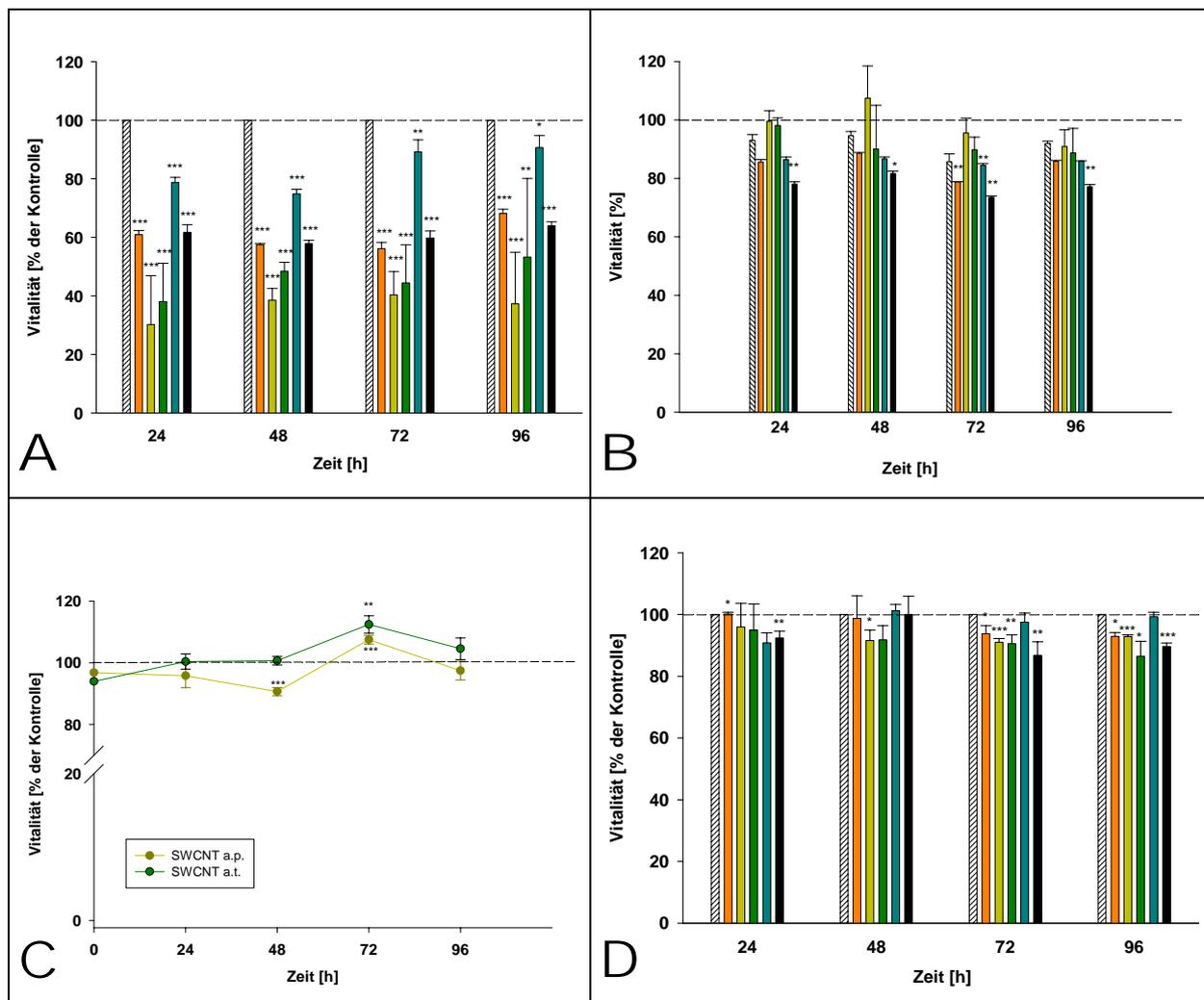
Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubation gründlich mit HBSS gewaschen und daraufhin mit 10% MTT-Stammlösung für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte das Herauslösen der Formazan-Kristalle sowie die photometrische Bestimmung der Menge an gebildetem Formazan.

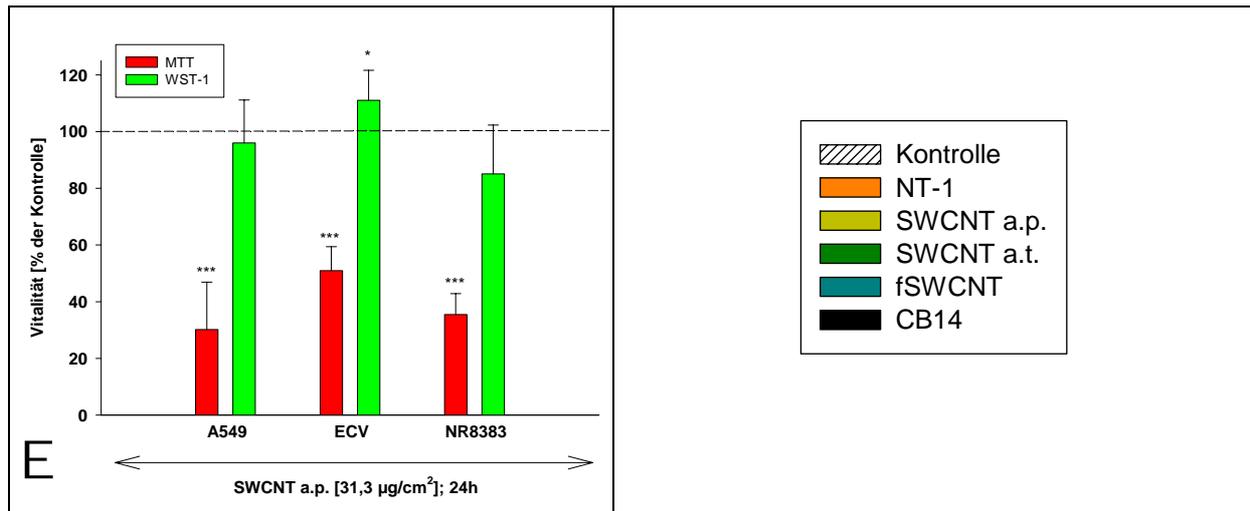
Das Ergebnis in Abb.4.5 (A) zeigt, dass die mitochondriale Aktivität der Zellen nach Inkubation mit Nanotubes schon nach 24 Stunden bis zu 60% (SWCNT a.p., SWCNT a.t.) beeinträchtigt wurde. Dieser Vitalitätsverlust wurde nach längerer Inkubationszeit jedoch nicht weiter gesteigert. Die Ergebnisse der einzelnen *Carbon Nanotube* Materialien waren in ihrer Wirkung vergleichbar, auch wenn leichte Unterschiede in der Höhe des gemessenen Formazans beobachtet werden konnten. Die funktionalisierten *Carbon Nanotubes* (fSWCNT) zeigten hierbei den geringsten cytotoxischen Effekt auf die Aktivität der Dehydrogenasen. Die Wirkung von CB14 und CNT-Partikeln war miteinander vergleichbar.

Aufgrund der Ergebnisse aus dem MTT-Test wurde zur Überprüfung dieses starken cytotoxischen Effektes ein weiterer Vitalitätstest, der LDH-Test, durchgeführt (Abb.4.5 (B)). Die Membranintegrität ist für lebende Zellen ein wichtiger Parameter zur Erhaltung der Homöostase gegenüber dem umgebenden Medium. Aus diesem Grund kann die Laktatdehydrogenase (LDH), ein cytoplasmatisches Enzym, im Überstand als Parameter

zur Überprüfung der Membranintegrität und Zellvitalität genutzt werden. Für die Durchführung dieses Tests wurden die Überstände aus dem CNT-inkubierten Zell-Ansatz des MTT-Tests verwendet, mit der LDH-Reaktionslösung inkubiert und schließlich im Absorptionsreader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Überraschenderweise konnte hier im Gegensatz zum MTT-Test kein Vitalitätsverlust festgestellt werden. Die Abb.4.5 (B) zeigt, dass eine Inkubation der A549 Zellen mit den verschiedenen CNTs weder nach 24 Stunden noch nach Langzeitinkubation von bis zu 96 Stunden zu einem signifikanten Verlust der Zellmembranintegrität führte. Lediglich die stark verunreinigten NT-1 wiesen einen leichten Vitalitätsverlust von ~10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Die CB14 behandelten Zellen zeigten im gesamten Zeitraum einen leichten, bis zu 20%-igen, Vitalitätsverlust.





**Abb.4.5: Effekte von Carbon Nanotubes auf die Vitalität von Zellen**

A549 Zellen wurden für einen Zeitraum von 24h - 96h mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) Carbon Nanotubes und Carbon Black (CB14) inkubiert. Das Ergebnis zeigt den Effekt der Nanotubes auf die Zellvitalität, gemessen mit verschiedenen Vitalitätstests und dargestellt als % der Kontrolle, die als 100% vital gesetzt wurde. (A) MTT-Test (B) LDH (C) PI-Färbung (D) WST-1 (E) Vergleich MTT-Test und WST-1 nach Inkubation verschiedener Zelllinien mit SWCNT a.p. für 24h. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

Aufgrund dieser scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse aus dem MTT-Test (Abb.4.5 (A)) und dem LDH-Test (Abb.4.5 (B)) wurde schließlich eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt, welches ein weiterer Parameter zur Überprüfung der Zellmembranintegrität ist (Abb.4.5 (C)). Der PI Farbstoff kann aufgrund seiner Größe und Polarität nur durch perforierte Zellmembranen in die Zelle diffundieren und lagert sich ausschließlich an die DNA der Zellen an. So ermöglicht das Anfärben mit PI eine Unterscheidung in vitale und nekrotische, tote Zellen. Die CNT-inkubierten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubation mit PI gefärbt, im Durchflusszytometer bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Fluoreszenz im Kanal FL-6 (610 nm) gemessen.

Mithilfe dieser Färbemethode konnte das Ergebnis des LDH-Tests bestätigt werden, da es nach Partikelinkubation weder durch die SWCNT a.p. noch durch SWCNT a.t. in einem Zeitraum von bis zu 96 Stunden zu einem signifikanten Verlust der Membranintegrität bzw. der Gesamtvitalität kam.

Wegen des scheinbar stark toxischen Effektes der Carbon Nanotubes auf die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, welcher im MTT-Test gezeigt werden konnte, wurde weiterhin angenommen, dass die Partikel einen spezifischen Effekt auf die Mitochondrien ausüben. Dies sollte durch einen weiteren Vitalitätstest, dem WST-1 Test bestätigt werden, der wiederum die Aktivität der Mitochondrien misst (Abb.4.5 (D)).

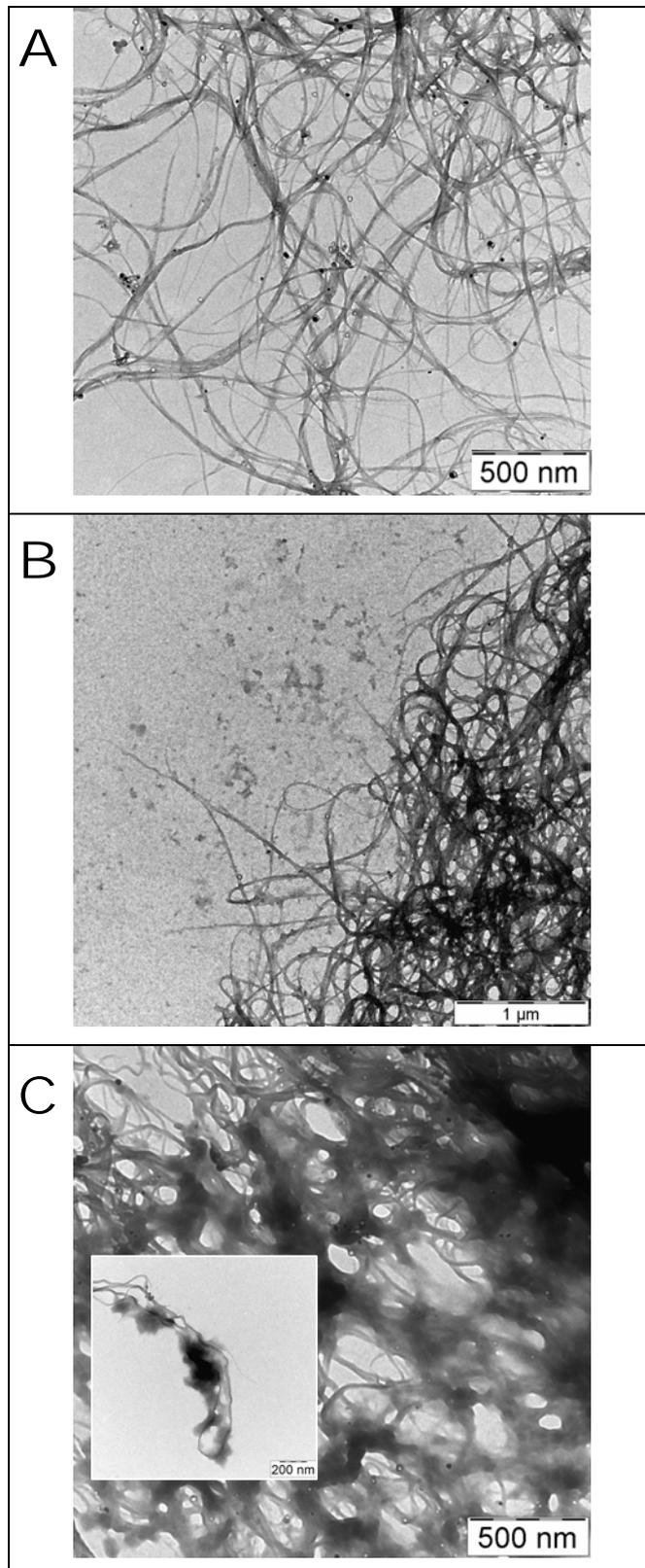
Der Test beruht wie im MTT-Test auf der Reduktion eines Tetrazoliums Salzes (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, WST-1) durch die mitochondrialen Dehydrogenasen.

Nach erfolgter Partikelinkubation wurden die Zellen mit 10% WST-1 Stammlösung für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert und der Formazan-Farbstoff anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet.

Im Gegensatz zum MTT-Test zeigte sich jedoch hier kein signifikanter Verlust der Vitalität bzw. Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen nach CNT Inkubation (Abb.4.5 (D)). Dieses Ergebnis bestätigt wiederum die Beobachtungen des LDH-Tests und der PI-Färbung des geringen bzw. fehlenden Einflusses von *Carbon Nanotubes* sowohl auf die mitochondriale Aktivität als auch auf die Zellmembranintegrität.

In Abb.4.5 (E) ist der Vergleich von MTT- und WST-1-Tests nach 24h SWCNT a.p.-Inkubation ( $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  [ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ]) verschiedener Zelllinien (A549, ECV304, NR8383) zusammengefasst. Die graphische Darstellung macht deutlich, dass die beobachteten widersprüchlichen Ergebnisse, die aus dem MTT und WST-1 Testsystemen gewonnen wurden, welche die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen testen, unabhängig von den verwendeten Zelllinien und Zelltypen sind. Sowohl humane Lungenepithel- und Endothel-ähnliche Zellen als auch Alveolarmakrophagen der Ratte zeigen vergleichbare Ergebnisse.

### 4.3.2 Kohlenstoff Nanoröhren interagieren mit MTT-Formazan im Vitalitätstest



Die TEM-Aufnahmen in Abb. 4.6 zeigen SWCNT a.t. in unterschiedlichen Stadien während der Durchführung der Vitalitätstests.

Abb. 4.6 (A) zeigt eine Probe von SWCNT a.t., die 24h in Zellkulturmedium inkubiert wurde. Die Nanotubes liegen als ungeordnetes Bündel vor und zeigen keinerlei auffällige Besonderheiten. Des Weiteren sind SWCNT a.t. dargestellt, die nach Ablauf einer 24h Inkubation mit anschließendem WST-1 extrahiert wurden (Abb. 4.6 (B)). Die Struktur der Partikel weist auch hier keine besondere Auffälligkeit im Vergleich zu (A) auf. In Abb. 4.6 (C) sind ebenfalls SWCNT a.t. Nanoröhren dargestellt, welche aber im Zellsystem nach 24h Inkubation anschließend mit MTT behandelt wurden.

#### Abb. 4.6: TEM Präparationen von SWCNT a.t. nach 2h Inkubation mit verschiedenen Tetrazoliumsalzen

TEM-Aufnahmen von SWCNT a.t. nach Inkubation von A549 Zellen mit SWCNT a.t. für 24h und Behandlung mit Tetrazoliumsalzen. (A) Inkubation in Medium ohne Tetrazoliumfarbstoff (Vergrößerung: 20.000x) (B) Inkubation mit WST-1 (Vergrößerung: 12.000x) (C) Inkubation mit MTT und Extraktion mit Isopropanol/HCl (Vergrößerung: 20.000x/ 30.000x).

MTT ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen zu wasserunlöslichen MTT-Formazan-Kristallen reduziert wird, anschließend gelöst und die Farbintensität photometrisch am Absorptionsreader quantifiziert wird. Im Vergleich zu den SWCNT a.t. Präparationen in (A) und (B) zeigen die Partikel in Abb. 4.6 (C) deutliche morphologische Veränderungen. Die Nanotubes sind irreversibel mit dem Formazan-Farbstoff bedeckt, der die Partikel eng miteinander verklebt und sich weder durch physikalische noch chemische Einwirkungen ablösen lässt (Daten nicht gezeigt). Der Farbstoff wird so aus dem Testsystem entfernt und die quantitative Messung führt, in Bezug auf die cytotoxische Wirkung der Kohlenstoff Nanoröhren im *in vitro* System, zu einem falsch-positiven Ergebnis, gemessen mit dem MTT-Test.

### **4.3.3 Kohlenstoff Nanoröhren induzieren keine Apoptose in humanen Lungenepithelzellen**

In den zuvor beschriebenen Ergebnissen kristallisierte sich heraus, dass eine Behandlung humaner Lungenepithelzellen, sowie Endothel-ähnlicher Zellen (ECV304) mit den verschiedenen *Carbon Nanotube*-Materialien zu keiner akuten Beeinträchtigung der Zellvitalität führt (Abb.4.5).

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden drei Arten des Zelltodes beschrieben, der programmierte Zelltod (Apoptose), die Nekrose und die Autophagie. Mit dem Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (Abb.4.5 (C)) konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer Anhäufung nekrotischer Zellen nach Exposition mit Nanotubes gekommen ist.

Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob es jedoch zu frühen Anzeichen von Apoptose in diesen Zellen kommt.

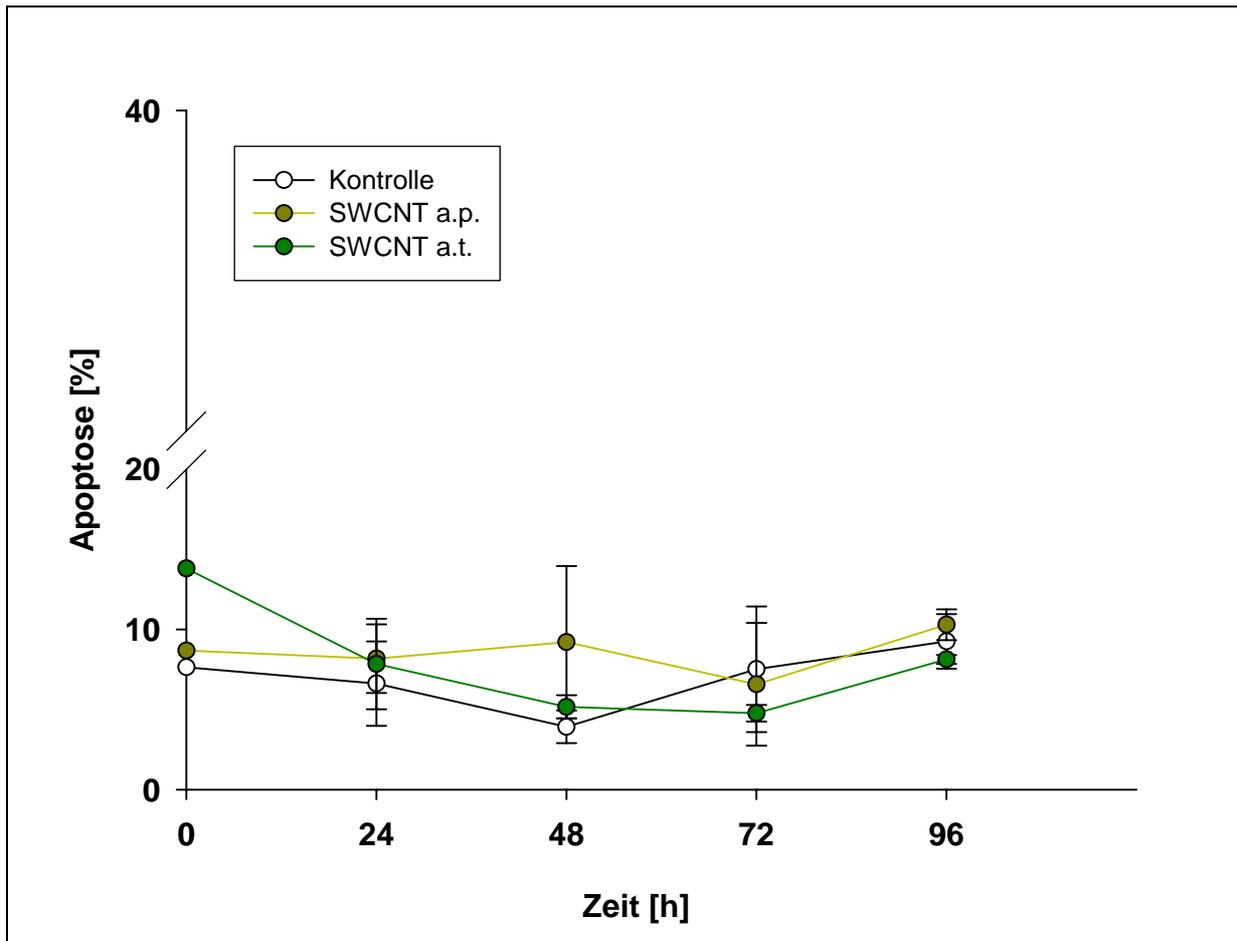
Für ultrafeines *Carbon Black* konnte gezeigt werden, dass es in Lungenepithelzellen der Ratte zu einer Apoptoseinduktion kommt (Sydlik et al., 2006). Über den apoptotischen Einfluss von CNTs auf Lungenzellen ist hingegen nur sehr wenig bekannt (Dumortier et al., 2006; Tian et al., 2006).

Ein charakteristisches Merkmal gesunder, vitaler Zellen ist eine Asymmetrie der Membranlipide. Hierbei sind z.B. Phosphatidylcholin (PC) sowie Sphingomyelin vorwiegend auf der Außenseite lokalisiert, während Phosphatidylethanolamin (PE) und

Phosphatidylserin (PS) hauptsächlich auf der Innenseite der Zellmembran aufzufinden sind. Durch einen apoptotischen Stimulus wird diese Asymmetrie der zellulären Membran jedoch unterbrochen, wobei das PS auf die Außenseite der Membran verlagert wird. Diese Externalisierung von PS wird als frühes Anzeichen des apoptotischen Zelltodes beschrieben.

Zur Ermittlung einer möglichen induzierten Apoptose durch Kohlenstoff Nanoröhren sollte nun geklärt werden, ob CNTs eine Umverteilung dieses Membranlipids hervorrufen. PS kann spezifisch mit Annexin V markiert werden, das an das Fluorchrom Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist und somit als ein spezifischer Apoptose Marker verwendet werden kann.

Zur Untersuchung der PS-Externalisierung wurden A549 Zellen für 24 bis 96 Stunden mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) SWCNT a.p. und SWCNT a.t. inkubiert, anschließend mit Annexin V angefärbt und das grün fluoreszierende FITC in Kanal FL-1 (530 nm) im Durchflusszytometer angeregt und quantitativ ausgewertet. In Abb.4.7 ist deutlich zu erkennen, dass die CNT-inkubierten Zellen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen zeigten. Nach 24 Stunden liegt die Anzahl der apoptotischen Zellen in den Kontrollen sowie nach Behandlung mit Nanotubes bei 10 - 15%, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen. Im Verlauf der Inkubation bis zu 96 Stunden veränderte sich dieser Wert kaum, weder in den CNT-inkubierten Zellen, noch in den unbehandelten Kontrollen.



**Abb.4.7: Durchflusszytometrische-Analyse der Annexin V-Färbung**

Zur quantitativen Erfassung apoptotischer Fraktionen wurden A549 Zellen für einen Zeitraum von 24 bis 96 Stunden mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) SWCNT a.t. und SWCNT a.p. inkubiert und nach erfolgter Färbung mit Annexin V mithilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM.

Die Ergebnisse der Annexin V Analyse zeigen eindeutig im Zusammenhang mit den Resultaten des MTT-, WST-1- und LDH-Tests, sowie der PI-Färbung, dass *Carbon Nanotubes* in dem verwendeten zellulären System, mit den Konzentrationen und Inkubationszeiträumen keinerlei akut cytotoxische Wirkung aufweisen. Es konnte weder ein nekrotischer noch apoptotischer Effekt nachgewiesen werden.

Wie diese Nanoröhren möglicherweise jedoch weitere zelluläre Endpunkte beeinflussen und welche Reaktionen dies zur Folge haben kann, soll in den folgenden Versuchsreihen ermittelt werden.

---

#### **4.4 Geringe Proliferationssteigerung von humanen Lungenepithelzellen nach Inkubation mit Kohlenstoff Nanoröhren**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *Carbon Nanotubes* keine akut cytotoxische Wirkung auf verschiedene Zellsysteme ausüben, sollte im Folgenden das Wachstumsverhalten und die DNA-Neusyntheserate von A549 Zellen nach Exposition mit den verschiedenen CNT-Materialien kontrolliert werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass ultrafeines *Carbon Black* proliferativ auf Lungenepithelzellen der Ratte wirkt (Sydlik et al., 2006), während insbesondere die Metallverunreinigungen von Ultrafeinstäuben zu einer Inhibierung der Zellproliferation von Lungenepithelzellen führen können (Okeson et al., 2003). Der Einfluss von Kohlenstoff Nanoröhren auf die Zellproliferation ist allerdings kaum untersucht (Cui et al., 2005; Garibaldi et al., 2006; Kam and Dai, 2005).

Die Klärung dieser Fragestellung erfolgte zunächst mithilfe einer Wachstumskurve der humanen Lungenepithelzelllinie A549 (Abb. 4.8). Hierfür wurden A549 Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  in 3 ml Kulturmedium ausgesät und für 24 Stunden zum Anwachsen im Brutschrank gelassen. Am folgenden Tag wurde die Zellzahl für den Startmesspunkt ermittelt und die Ansätze mit jeweils  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  der verschiedenen *Carbon Nanotubes* behandelt. Zur genauen Analyse der für die Zellen typischen Wachstumsgeschwindigkeit sowie als Kontrolle blieb eine Charge der Proben gänzlich unbehandelt und wurde für einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet. In einem Abstand von jeweils 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in den entsprechenden Ansätzen mit Hilfe des Casy®1.

Die A549 Zelllinie zeigte in allen Ansätzen ein gesundes, aber leicht unterschiedlich starkes Wachstum (Abb. 4.8). Im Allgemeinen konnte jedoch eine Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden dokumentiert werden. Die Behandlung der Zellen mit *Carbon Nanotubes* zeigte keine offensichtlich großen Unterschiede sowohl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als auch innerhalb der verschiedenen CNT-Sorten. Lediglich eine leichte Wachstumssteigerung der CNT-inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte hier festgestellt werden, welche nach 24h sichtbar wurde und sich im Verlauf der Inkubation weiter ausprägte. Hierbei zeigten die DMF- (SWCNT a.p.), bzw. Säure-

behandelten (SWCNT a.t.) Nanotubes sowie die funktionalisierten CNTs (fSWCNT) ein ähnliches Verhalten.

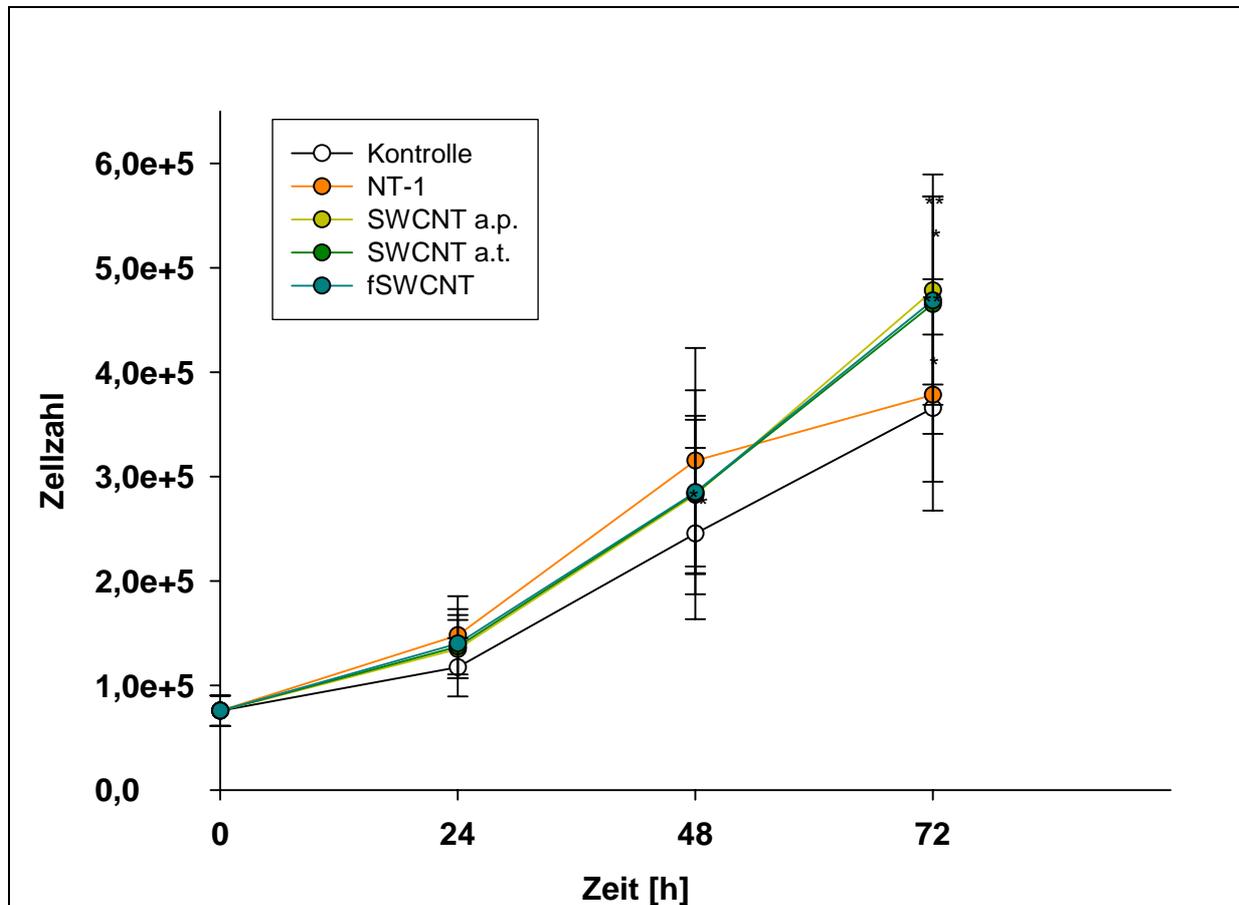


Abb. 4.8: Wachstumsverhalten von A549 Zellen nach Carbon Nanotube Inkubation ( $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  [ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ])

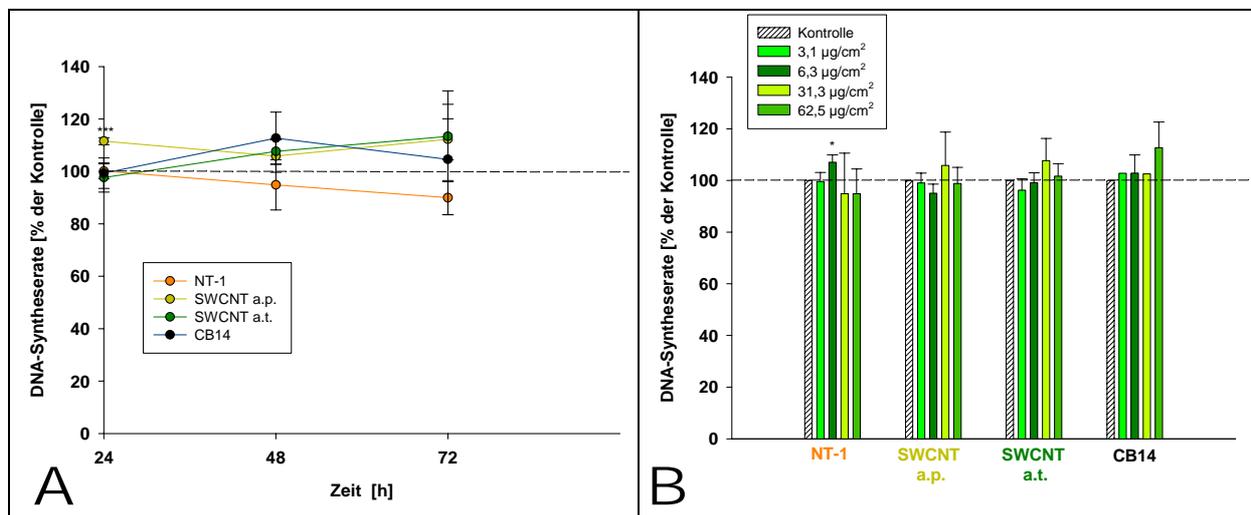
$5 \times 10^4$  Zellen wurden ausgesät und nach 24h (Startzeitpunkt 0h) mit NT-1, SWCNT a.p., SWCNT a.t. und fSWCNT behandelt. Nach den jeweiligen Zeitpunkten konnte die Zellzahl bestimmt und graphisch aufgetragen werden. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

Neben der Überprüfung der Wachstumsrate von CNT-inkubierten A549 Zellen sollte weiterhin die DNA-Neusyntheserate kontrolliert werden. Hierfür wurden die Zellen wiederum mit den entsprechenden Partikelsuspensionen ( $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  [ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ]) für einen Zeitraum von drei Tagen inkubiert und die Proliferationsrate jeweils nach Ablauf von 24 Stunden mithilfe des BrdU-Tests gemessen.

Der BrdU-Test ist ein immunologischer *in vitro* Proliferations-Test, der auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in die neusynthetisierte DNA proliferierender Zellen beruht. Die entstehende Farbintensität korreliert mit der Anzahl proliferierender Zellen und kann im Absorptionsreader bei einer Wellenlänge von 450 nm quantitativ nachgewiesen werden. Für die graphische Darstellung und einen besseren Vergleich der Ergebnisse untereinander wurde die

Negativkontrolle 100% gesetzt, die gemessenen Werte im Verhältnis dazu errechnet und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Die Behandlung der Zellen mit *Carbon Nanotubes* zeigte auch hier nur sehr geringe Unterschiede in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (Abb.4.9). Sowohl innerhalb der verschiedenen CNT-Materialien (Abb.4.9 (A)) als auch in der dargestellten Dosis-Wirkungs-Beziehung (B) nach 48 Stunden Inkubation mit Konzentrationen von  $3,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) bis  $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) konnte keine Beeinträchtigung der DNA-Syntheserate und somit der Proliferation von CNT-behandelten A549 Zellen in einem Zeitraum von 3 Tagen festgestellt werden. Lediglich, wie schon die in Abb. 4.8 dargestellte leichte Wachstumssteigerung, konnte auch hier eine geringe Erhöhung der DNA-Synthese in SWCNT a.p.-, und SWCNT a.t.-behandelten Zellen gemessen werden.



**Abb.4.9: DNA-Syntheserate von A549 Zellen nach Carbon Nanotube Inkubation**

(A) A549 Zellen wurden mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) Kohlenstoff Nanoröhren für einen Inkubationszeitraum von drei Tagen behandelt. Jeweils nach Ablauf von 24h wurde die Proliferationsrate mithilfe des BrdU-Assays gemessen und quantifiziert. (B) Die Zellen wurden 48h mit aufsteigenden Konzentrationen  $3,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) –  $62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) *Carbon Nanotubes* und CB14 behandelt. Das Ergebnis zeigt die Proliferationsrate in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis, gemessen mit dem BrdU-Test. Die Ergebnisse sind als Prozent der Kontrolle dargestellt, die auf 100% gesetzt worden ist. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

## **4.5 Oxidativer Stress**

Eine stetig anwachsende Zahl von Daten zeigt, dass Nanopartikel Entzündungen und Oxidativen Stress hervorrufen können. Dabei hat sich ein, aufgrund von experimentellen Studien, für Nanopartikel typisches Profil gebildet, welches zeigt, dass es einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Größe, der Oberfläche und der Fähigkeit, Oxidativen Stress und damit pro-inflammatorische Effekte zu erzeugen, gibt, wie z.B. die Aktivierung inflammatorischer Signalwege (Brown et al., 2004; Donaldson et al., 2004; Koike and Kobayashi, 2006; Nel, 2005; Oberdörster et al., 2005). Aus diesem Grund ist eine Evaluation des oxidativen Potentials von Nanopartikeln einer der wichtigsten Parameter, um eine mögliche Toxizität zu charakterisieren.

In diesem Zusammenhang sollte im Folgenden die Fähigkeit der *Carbon Nanotubes*, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu induzieren, überprüft werden.

### **4.5.1 Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Kohlenstoff Nanoröhren**

Im Körper kommt es fortlaufend zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), z.B. bei der Elektronentransportkette in den Mitochondrien, aber auch während der zellulären Immunantwort. Normalerweise wird die Bildung von ROS durch anti-oxidative Prozesse, zu welchen u.a. die Änderung des zellulären Glutathiongehalts und die Induktion der Hämoxygenase-1 (HO-1) zählen, im Gleichgewicht gehalten. Kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und der Fähigkeit, diese zu neutralisieren und zu eliminieren, entsteht Oxidativer Stress, der zellschädigende Effekte, wie z.B. Lipid-, Protein- und DNA-Schädigung aber auch Entzündungsreaktionen, auslösen kann.

Für Ultrafeinstäube (Brown et al., 2000; Hiura et al., 1999; Martin et al., 1997; Stone et al., 2000) wie z.B. für *Carbon Black*, sowie Asbestfasern (Manning et al., 2002; Mossman et al., 1990), als auch für Nanopartikel (Limbach et al., 2007; Oberdörster, 2004; Xia et al., 2006) ist bekannt, dass sie die Fähigkeit besitzen, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies zu induzieren und so die Partikelexposition zu Oxidativem Stress und Entzündungen führen kann. In der folgenden Versuchsreihe sollte diese Fähigkeit mit dem vorhandenen CNT-Material überprüft werden.

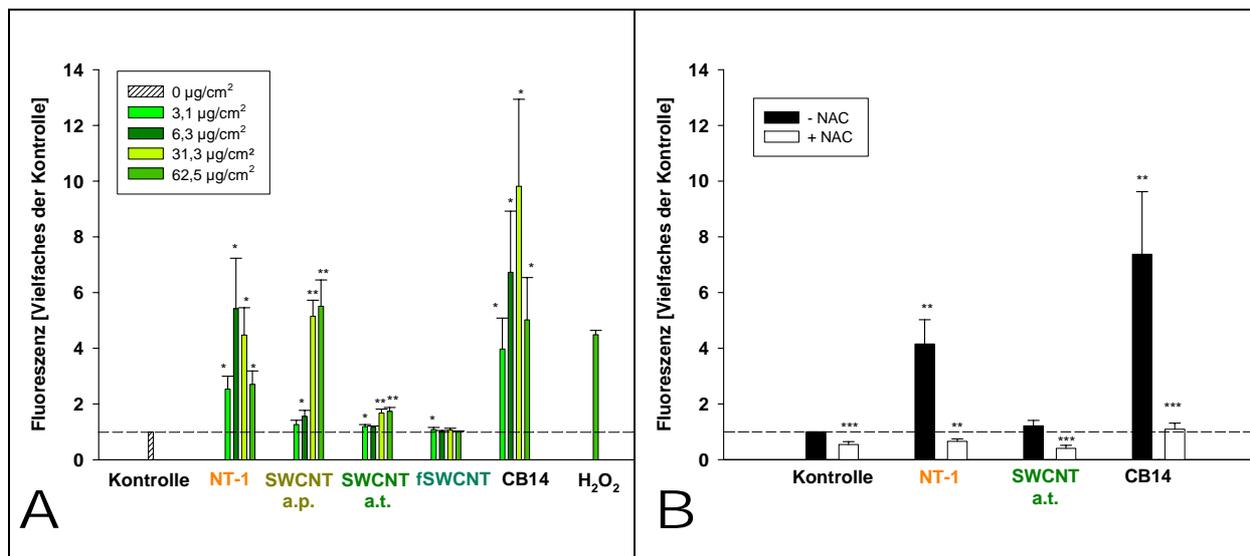
Der Nachweis von unspezifischen intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies („*Reactive Oxygen Species*“, ROS) erfolgte mithilfe von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA). Das H<sub>2</sub>DCF-DA ist zellpermeabel und wird durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert, so dass der Farbstoff in der Zelle verbleibt. In Gegenwart von ROS, wie z.B. Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, •OH, •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, wird der Farbstoff in das fluoreszierende DCF umgewandelt, welches im Fluoreszenzreader bei 530 nm nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Für die Durchführung des Tests wurden A549 Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von Nanotubes (3,1 µg/cm<sup>2</sup> [5 µg/ml] bis 62,5 µg/cm<sup>2</sup> [100 µg/ml]) für 24 Stunden behandelt. Eine Charge von Zellen wurde einstündig mit 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und diente als Positivkontrolle. Nach Beendigung der Inkubation wurde der Zellrasen gründlich mit PBS gewaschen, um nicht aufgenommene Partikel zu entfernen und um so ein Quenchen des Fluoreszenzsignals durch die schwarzen Partikel weitestgehend zu verhindern. Schließlich erfolgte das Inkubieren der Zellen für 40 Minuten mit dem Farbstoff und die Messung am Fluoreszenzreader. Die Fluoreszenzmessung der unbehandelten Kontrolle wurde gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der behandelten Proben als Vielfaches der Kontrolle dargestellt.

Auffallend bei diesem Ergebnis war, dass es zu deutlichen Unterschieden in der ROS-Freisetzung innerhalb der verschiedenen CNT-Materialien kam (Abb.4.10 (A)). Nur diejenigen Zellen, die mit den verunreinigten NT-1, SWCNT a.p., aber nicht mit den aufgereinigten SWCNT a.t. oder funktionalisierten fSWCNT inkubiert waren, wiesen eine annähernd dosis-abhängige Erhöhung der gemessenen Fluoreszenz auf. Eine Konzentration von nur 6,3 µg/cm<sup>2</sup> NT-1 führte nach 24 Stunden schon zu einem fast fünffachen ROS Anstieg. Auch die DMF-behandelten SWCNT a.p. induzierten nach Inkubation von 31,3 µg/cm<sup>2</sup> eine deutliche ROS-Entwicklung, die mit den NT-1 und den *Carbon Black* (CB14) Ergebnissen vergleichbar war. Eine Behandlung der Zellen mit den aufgereinigten SWCNT a.t. und den funktionalisierten fSWCNT führte jedoch überraschenderweise zu keinerlei ROS-Bildung. Die gemessene Fluoreszenz blieb hier im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Diese Beobachtung der ROS-Induktion konnte ebenfalls in der Endothel-ähnlichen Zelllinie ECV304 gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Abb.4.10 (B) zeigt die Auswirkung des Antioxidanz N-acetyl-L-cystein (NAC) auf die Kohlenstoff Nanotube-induzierte ROS-Freisetzung. A549 Zellen wurden für 24 Stunden mit 31,3 µg/cm<sup>2</sup> (50 µg/ml) CNTs inkubiert und eine Charge jeweils zusätzlich mit 10 mM NAC behandelt. Hier zeigte sich deutlich, dass die Zugabe des Antioxidanz

NAC tatsächlich die CNT-induzierte ROS-Freisetzung hemmen kann. Die vier-, bis sechsfache Erhöhung der Fluoreszenz nach NT-1 und CB14-Inkubation konnte mithilfe von NAC deutlich vermindert werden und lag im Bereich der Negativkontrolle. Die SWCNT a.t.-Behandlung wies auch hier keine ROS-Freisetzung auf und auch die NAC-Co-Inkubation zeigte keinerlei Auswirkungen.



**Abb.4.10: Carbon Nanotube-induzierte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies**

(A) Für die Messung der Freisetzung von ROS wurden A549 Zellen für 24h mit aufsteigenden Konzentrationen (3,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  – 62,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  [5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  – 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]) der verschiedenen *Carbon Nanotubes* behandelt, mit 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCF-DA beladen und die Umsetzung des Farbstoffes in das fluoreszierende DCF gemessen. Eine einstündige Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diente als Positivkontrolle. (B) A549 Zellen wurden mit 31,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 24h mit *Carbon Nanotubes* behandelt und jeweils parallel zusätzlich mit dem Antioxidanz N-acetyl-L-cystein (NAC) inkubiert. Die unbehandelten Kontrollen wurden gleich eins gesetzt und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

#### 4.5.2 Verzögerter „oxidative burst“ in gereinigten Kohlenstoff Nanoröhren

In Abb.4.10 konnte deutlich gezeigt werden, dass es starke Unterschiede in der Fähigkeit der ROS-Induktion innerhalb der verschiedenen Kohlenstoff Nanoröhren gibt und dass die Verunreinigungen der Nanotubes hierbei eine große Rolle spielen können. Um dies genauer zu überprüfen, wurden die folgenden Versuchsreihen durchgeführt.

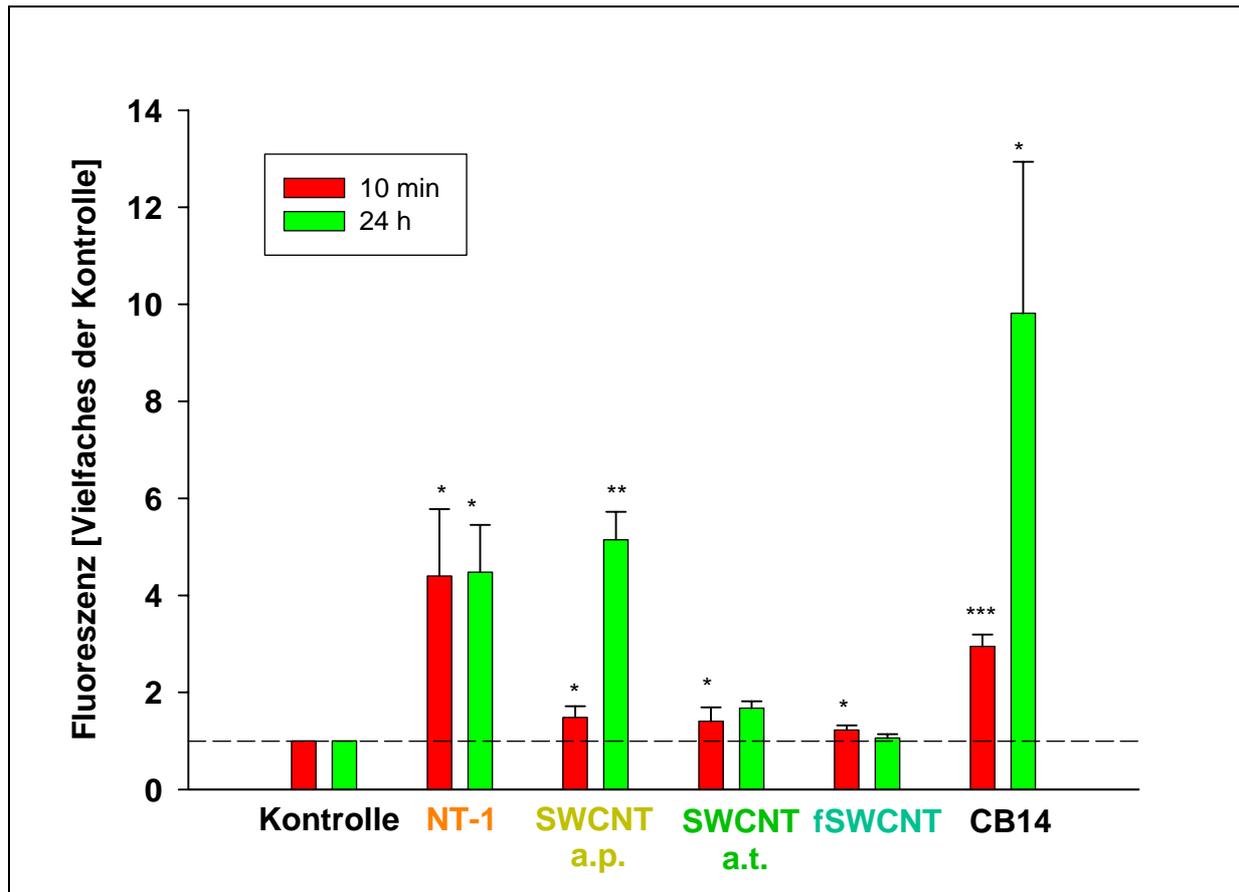
Kohlenstoff Nanoröhren werden mittels verschiedener Synthesemethoden hergestellt, die jeweils unterschiedliche Ausgangsmaterialien verwenden. Die Gemeinsamkeit besteht darin, dass eine Kohlenstoffquelle und Metall-Katalysatoren (z.B. Co, Ni, Fe) genutzt

werden, die ohne nachträgliche Aufreinigung, wie z.B. durch Säure, zu einem großen Teil im Rohmaterial der CNTs als Verunreinigung zurück bleiben.

Aufgrund der Unterschiede in der ROS-Induktion durch die verschiedenen *Carbon Nanotube*-Materialien (Abb.4.10 (A)) sollte nun überprüft werden, ob auch zeitliche Differenzen in der ROS-Freisetzung durch diese Besonderheiten hervorgerufen werden.

Hierfür wurden A549 Zellen für 10 Minuten als auch für 24 Stunden mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) Nanotubes inkubiert und die reaktiven Sauerstoffspezies mithilfe der Umwandlung des  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  in den Fluoreszenzfarbstoff DCF quantitativ am Fluoreszenzreader bei 530 nm gemessen. Die unbehandelten Kontrollen wurden wiederum gleich eins gesetzt und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle graphisch dargestellt.

Die Abb.4.11 zeigt die Unterschiede der ROS-Induktion nach Kurzzeit- (10 Minuten) und Langzeit-Behandlung (24 Stunden) der Zellen mit *Carbon Nanotubes*. Hier kann man sehen, dass es teilweise tatsächlich zu einem Unterschied in der zeitabhängigen ROS-Freisetzung gekommen ist. Die NT-1 Inkubation führte zu beiden Zeitpunkten zu einem fast vierfachen Anstieg der gemessenen Fluoreszenz, wohingegen Zellen, die 10 Minuten mit SWCNT a.p. behandelt worden waren, kaum ROS gebildet hatten. Jedoch nach 24 Stunden SWCNT a.p.-Inkubation konnte wiederum ein Vielfaches der Kontrolle an Fluoreszenz gemessen werden. Wie schon in Abb.4.10 (A) gezeigt, wiesen die Zellen nach SWCNT a.t.- sowie fSWCNT-Behandlung zu keinem Zeitpunkt, weder nach 10 Minuten noch nach 24 Stunden, eine ROS-Freisetzung auf. Die CB14-inkubierten Zellen zeigten nach 10 Minuten schon eine Verdopplung der Fluoreszenz und nach Langzeitinkubation einen bis zu achtfachen Anstieg der gemessenen ROS.



**Abb.4.11: Vergleich der ROS-Induktion nach 10 Minuten und 24 Stunden CNT-Inkubation von A549 Zellen**

Die Zellen wurden entweder 10min oder 24h mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) *Carbon Nanotubes* behandelt. Anschließend wurde die ROS-Entwicklung mittels des DCF-Tests gemessen. Das Ergebnis zeigt die relative gemessene Fluoreszenzintensität nach  $50 \mu\text{M}$  DCF-Zugabe. Die unbehandelten Kontrollen wurden gleich eingesetzt und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

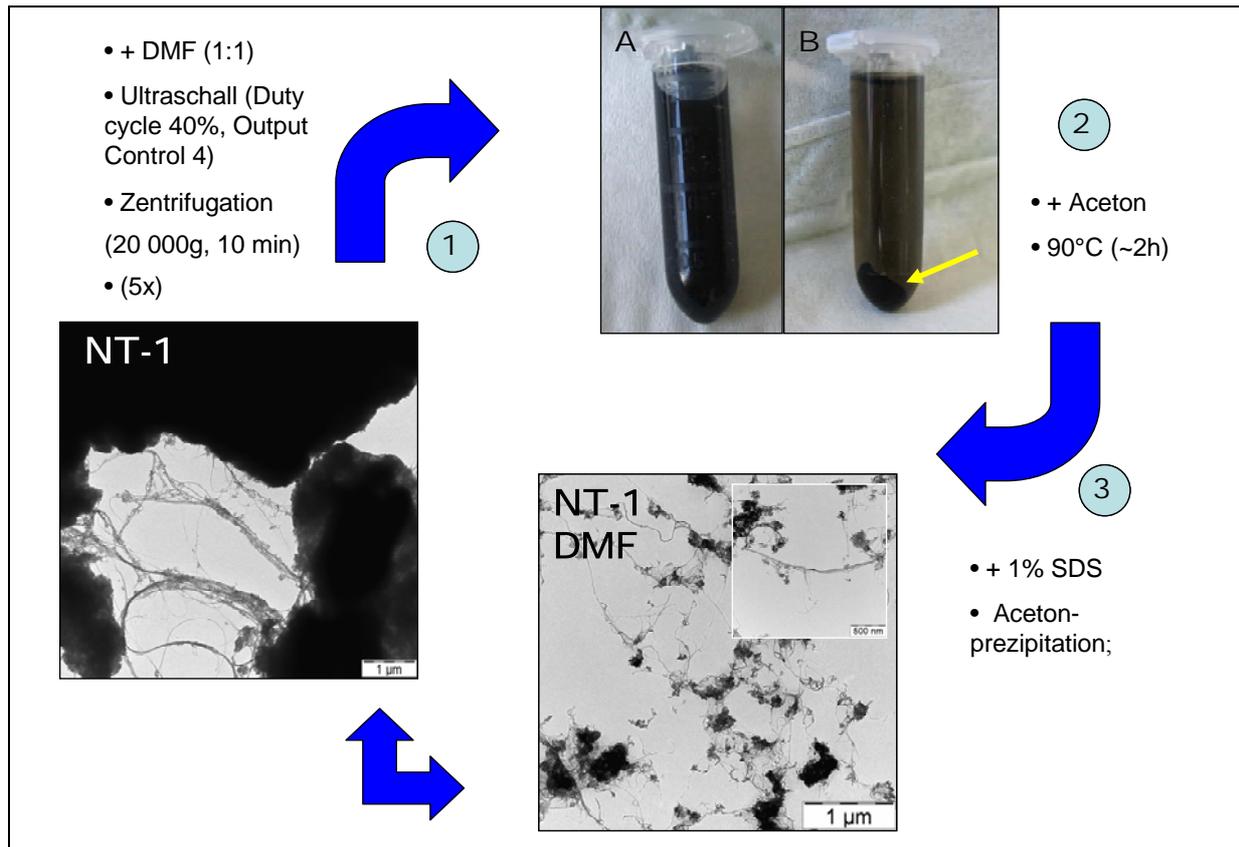
Wie in Abb.4.10 und Abb.4.11 beschrieben, zeigten die verwendeten Kohlenstoff Nanoröhren jeweils ein unterschiedliches Potential, ROS zu induzieren. Zur weiterführenden Untersuchung dieses Phänomens wurden bestimmte Verunreinigungen der CNTs extrahiert.

Die Säure-behandelten SWCNT a.t., die frei von amorphen Kohlenstoffresten sind und nur einen geringen Anteil an Metallverunreinigungen besitzen, zeigen weder in Langezeit- noch in Kurzzeitexposition von A549 Zellen eine ROS-Induktion. Die DMF-aufgereinigten SWCNT a.p. sind frei von amorphem Kohlenstoff, besitzen aber noch einen hohen Anteil an Metallverunreinigung und induzieren eine signifikante Freisetzung von ROS nach 24 Stunden, nicht aber nach 10 Minuten Inkubation. Dies zeigten nur die, sowohl mit verschiedenen Metallen als auch mit amorphem Kohlenstoff verunreinigten NT-1 (siehe auch Tabelle 3.3). Aus diesem Grund wurde eine, wie in der Literatur beschriebene DMF-Aufreinigung der NT-1 durchgeführt, um Reste des amorphen

Kohlenstoffs zu entfernen (Hennrich et al., 2003; Lebedkin et al., 2002). Die Durchführung dieser DMF-Aufreinigung ist schematisch in Abb.4.12 dargestellt.

Zunächst wurde hierfür das NT-1 Material zu gleichen Teilen mit Dimethylformamide (DMF) gewaschen, mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert, um den gelösten amorphen Kohlenstoff von den CNTs zu trennen. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Hierbei konnte das Herauslösen der Kohlenstoffverunreinigung in der zunehmenden Färbung des Überstandes beobachtet und dokumentiert werden (siehe Abb.4.12 (A, B)). Der gewonnene Überstand wurde zusätzlich noch einmal zentrifugiert, um den Verlust von CNTs möglichst gering zu halten. Das CNT-Pellet konnte schließlich mit Aceton gesäubert und bei ca. 90°C getrocknet werden. Die so gewonnenen NT-1 DMF wurden wie die übrigen CNTs in 1% SDS gelagert und vor der Verwendung jeweils frisch mit Aceton gefällt, mit H<sub>2</sub>O bidest. mehrmals gewaschen und die Konzentrationen in Zellkulturmedium hergestellt.

Die TEM-Aufnahme der NT-1 DMF in Abb.4.12 zeigt deutlich, dass die Behandlung mit Dimethylformamide tatsächlich zu einer Reduktion der Kohlenstoff-Verunreinigung geführt hat. Im Vergleich zu dem Rohprodukt NT-1 sehen die NT-1 DMF deutlich sauberer und vereinzelter aus. Allerdings konnte auch eine erhöhte Anzahl an CNT-Bruchstücken festgestellt werden, die vermutlich auf die Durchführung dieser Aufreinigung zurückzuführen sind.

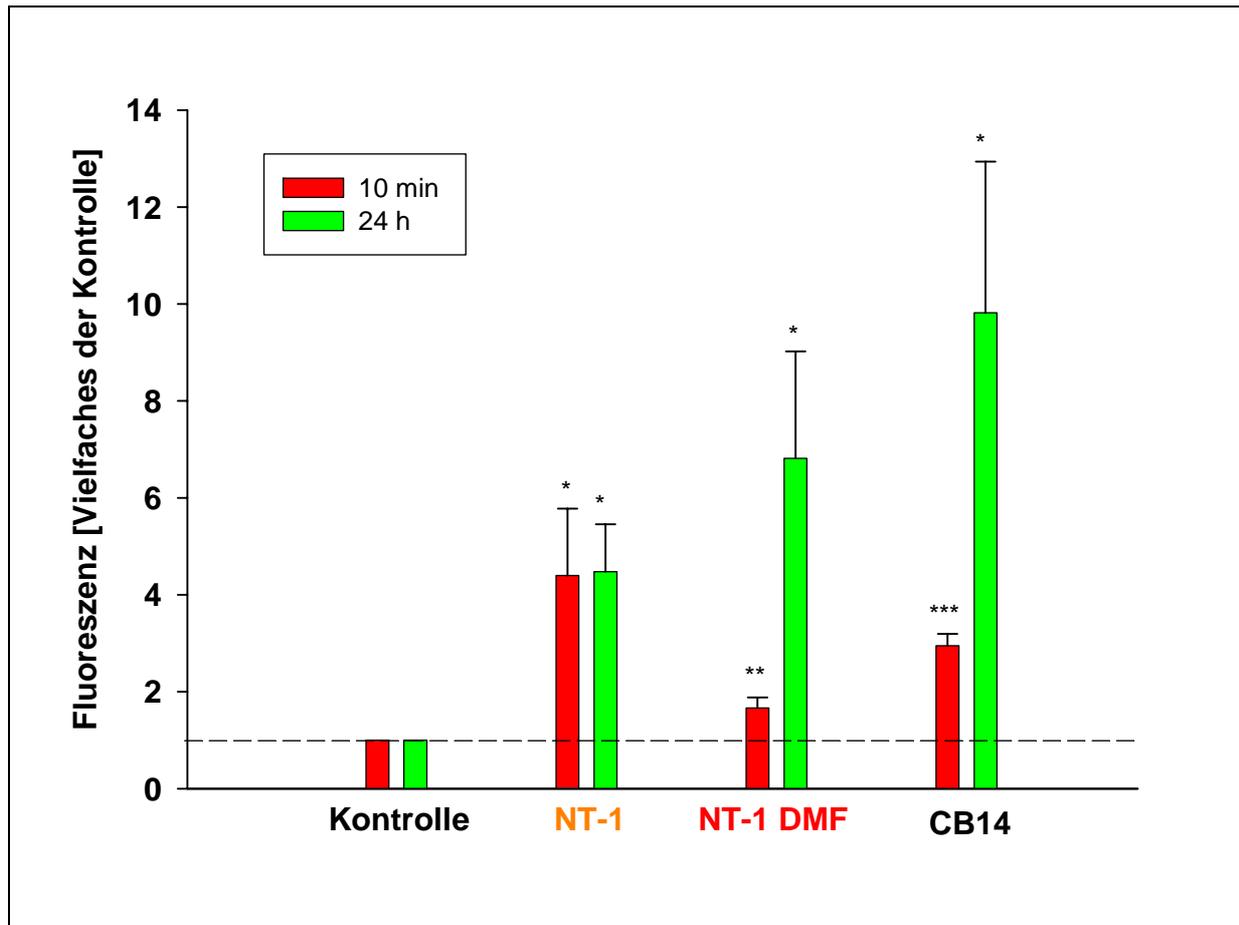


**Abb.4.12: Übersicht über die Aufreinigung von *Carbon Nanotubes* mithilfe von Dimethylformamide (DMF)**

(1) Die NT-1 Kohlenstoff Nanoröhren werden 1:1 mit DMF gewaschen, sonifiziert und abzentrifugiert, um den gelösten amorphen Kohlenstoff von den CNTs zu trennen. Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt. (1 A) In DMF aufgenommene NT-1. (1 B) CNT-Pellet mit Überstand nach dem Zentrifugieren. (2) Das NT-1 DMF-Pellet wird mit Aceton gewaschen und getrocknet. (3) Die Lagerung der NT-1 DMF erfolgte in 1% SDS mit anschließender Acetonpräzipitation zur Verwendung in der Zellkultur.

Zur Überprüfung des Potentials der DMF-behandelten NT-1 (NT-1 DMF) Oxidativen Stress zu erzeugen, wurden wiederum A549 Zellen für 10 Minuten, als auch für 24 Stunden mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) NT-1 DMF behandelt und die Reaktion der ROS-Freisetzung mit den übrigen CNTs verglichen.

Wie in Abb. 4.13 gezeigt, führte die nachträgliche DMF-Aufreinigung der NT-1 (NT-1 DMF) im Vergleich zum Rohprodukt, tatsächlich zu einem deutlichen Verlust der ROS-Induktion nach 10 Minuten Partikelexposition. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach 24 Stunden weiterhin eine starke Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies gemessen werden konnte. Die gemessene Fluoreszenz lag ungefähr beim Vierfachen der unbehandelten Kontrolle und war mit den Ergebnissen der ROS-Induktion von NT-1 und SWCNT a.p. vergleichbar (Abb.4.10).



**Abb. 4.13: ROS-Freisetzung nach 10 Minuten und 24 Stunden Inkubation von A549 Zellen mit DMF-aufgereinigten CNTs**

Die Zellen wurden entweder für 10min oder 24h mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) unbehandelten oder DMF-behandelten NT-1 inkubiert und anschließend die ROS-Entwicklung mittels des DCF-Tests gemessen. Das Ergebnis zeigt die relative gemessene Fluoreszenzintensität nach  $50 \mu\text{M}$  DCF-Zugabe. Die unbehandelten Kontrollen wurden gleich eins gesetzt und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

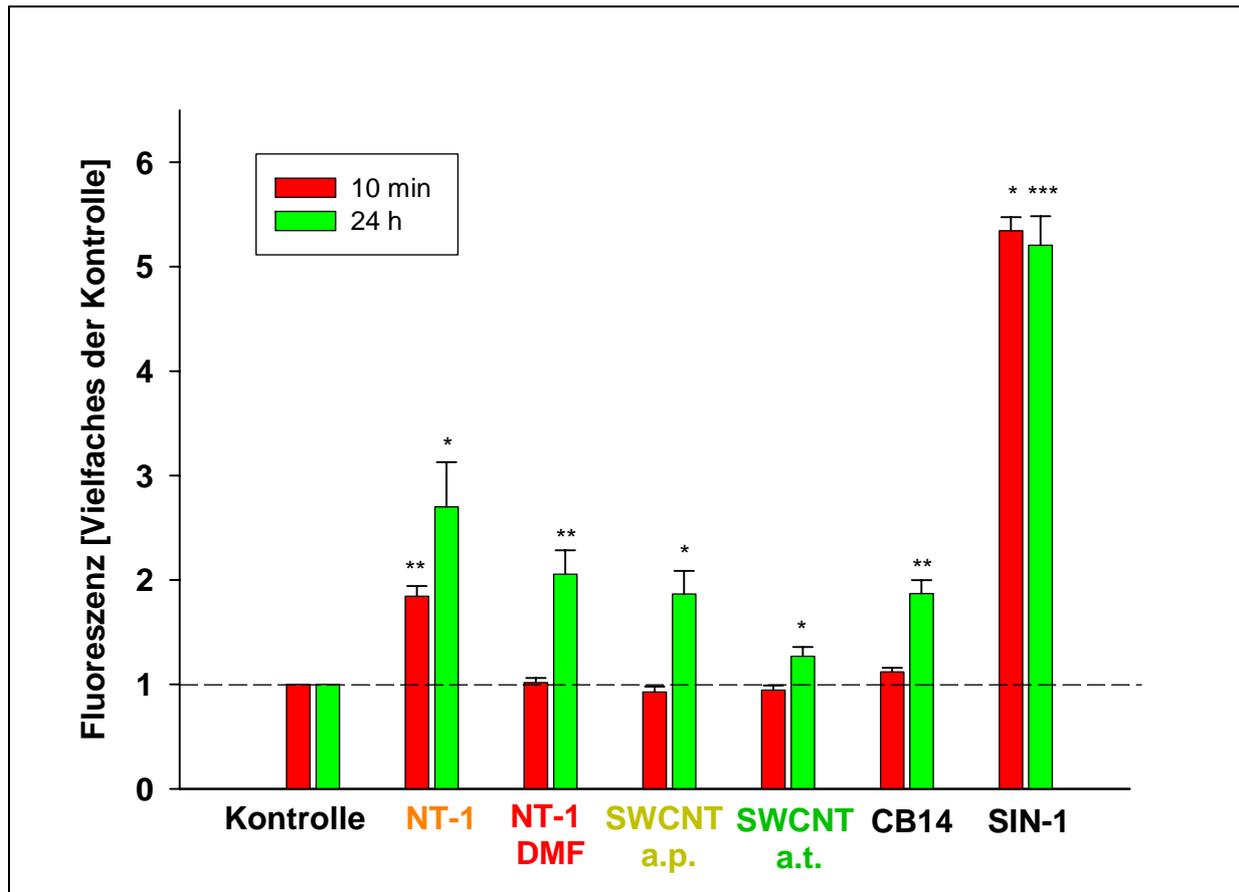
Aufgrund der in Abb. 4.13 dargestellten Ergebnisse, die zeigen konnten, dass die CNT-Verunreinigungen für die Partikel-induzierte ROS-Induktion eine bedeutende Rolle spielen können, sollte diese Beobachtung mit weiteren Testsystemen überprüft und abgesichert werden, da verschiedene Publikationen darauf hinweisen, dass die mit dem DCF-Test gewonnenen Ergebnisse kritisch zu betrachten sind (Bonini et al., 2006; Rota et al., 1999). Ein wichtiger Kritikpunkt ist zum einen der Verdacht der Selbstamplifikation des DCF-Tests aufgrund der Disproportionierung von  $\bullet\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welche in Anwesenheit von Peroxidasen wiederum mehr  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  zu DCF umwandelt, sowie des fragwürdigen Nachweises von  $\bullet\text{O}_2^-$  mithilfe dieses Tests.

Der DCF-Test konnte wie beschrieben zeigen, dass die verschiedenen CNT-Materialien einen verzögerten „oxidative burst“ in humanen Lungeneithelzellen (A549) in

Abhängigkeit ihrer amorphen Kohlenstoff-Verunreinigung induzieren können. Im Folgenden sollte diese Beobachtung mit der Dihydrorhodamine123 (DHR)- sowie Dihydroethidium (DHE)- Färbung überprüft und mithilfe dieser Tests spezifisch die Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) und Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) Bildung gemessen werden.

In Gegenwart von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) wird der Farbstoff Dihydrorhodamine123 (DHR) zum Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin123 oxidiert und kann am Fluoreszenzreader gemessen und quantifiziert werden. Die Fluoreszenzmessung der unbehandelten Kontrolle wurde gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der behandelten Proben als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Eine einstündige Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  3-Morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1) wurde in der folgenden Versuchsreihe als  $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$  Donor genutzt.

In Abb. 4.14 wird gezeigt, dass mithilfe von DHR123 ein signifikanter Anstieg der ROS und speziell von  $\text{ONOO}^-$  nach 24 Stunden A549 Inkubation mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) NT-1, NT-1 DMF und SWCNT a.p. gemessen werden konnte. Die gemessenen Werte zeigen das Zwei- bis Dreifache der unbehandelten Kontrollen. Lediglich das NT-1 Produkt wies, sowohl nach Kurzzeit (10min)- als auch nach Langzeitinkubation,  $\text{ONOO}^-$ -Induktion auf. Wie schon mittels des DCF-Tests (Abb.4.11) gezeigt, konnte auch hier zu keinem Zeitpunkt eine signifikante ( $p < 0.05$ ) ROS-Freisetzung durch SWCNT a.t Inkubation beobachtet werden.

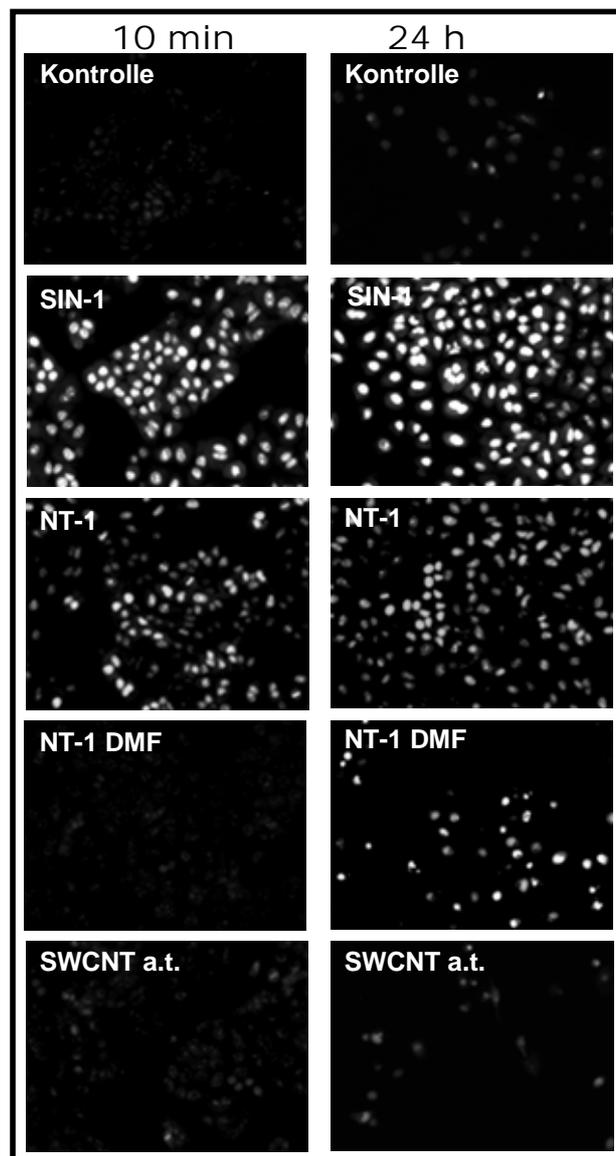


**Abb. 4.14: Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) Bildung nach 10 Minuten und 24 Stunden *Carbon Nanotube* Inkubation von A549 Zellen**

Die Zellen wurden entweder für 10min oder 24h mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) unterschiedlichen *Carbon Nanotubes* behandelt und anschließend die ROS und speziell die ONOO<sup>-</sup>-Entwicklung mittels der DHR123-Färbung gemessen. Das Ergebnis zeigt die relative gemessene Fluoreszenzintensität nach  $10 \mu\text{M}$  DHR123-Zugabe.  $1 \mu\text{M}$  SIN-1 diente als ONOO<sup>-</sup>/ONOOH Donor bzw. als Positivkontrolle. Die unbehandelten Kontrollen wurden gleich eins gesetzt und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

Der Nachweis eines weiteren reaktiven Sauerstoffradikals, dem Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) als Teil der ROS-Induktion und des daraus resultierenden Oxidativen Stresses, wurde fluoreszenzmikroskopisch über die Fluoreszenzentwicklung der DHE Oxidation gewonnen. A549 Zellen wurden in „chamber slides“ ausgesät und mit  $23,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) *Carbon Nanotubes* für entweder 10 Minuten oder 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Färbung der Zellen mit DHE und eine qualitative Auswertung im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm. Als Positivkontrolle diente in diesem Test eine einstündige Behandlung der Zellen mit  $1 \mu\text{M}$  3-Morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1), das als NO $\bullet$  und  $\bullet\text{O}_2^-$  Donor verwendet wird. DHE ist relativ spezifisch für  $\bullet\text{O}_2^-$ , kann aber auch mit  $\bullet\text{OH}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagieren (Munzel et al., 2002).

Die Färbung der Zellen mit DHE in Abb.4.15 zeigt, dass nur CNTs mit einem relativ hohen Verunreinigungsanteil (Metalle und/ oder amorpher Kohlenstoff) (NT-1, NT-1 DMF) die intrazelluläre Freisetzung von ROS und Superoxidanion Radikalen nach 24h induzieren können. Nach Entfernen des amorphen Kohlenstoffs (NT-1 DMF) kann der kurzfristig ausgelöste Stimulus der  $\bullet\text{O}_2^-$  Freisetzung verhindert werden. Die Eliminierung der Metall-Verunreinigungen sowie des amorphen Kohlenstoffs in den Säure-behandelten CNTs (SWCNT a.t.) verhinderte gänzlich den „oxidative burst“, unabhängig von der Inkubationszeit.



**Abb.4.15: Produktion von Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) in A549 Zellen nach Stimulation mit Carbon Nanotubes für 10 Minuten und 24 Stunden**

A549 Zellen wurden entweder für 10min oder 24h mit  $23,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) unterschiedlichen Carbon Nanotubes behandelt und anschließend die ROS und speziell die  $\bullet\text{O}_2^-$ -Entwicklung mittels der DHE-Färbung fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Das Ergebnis zeigt die relative Fluoreszenzintensität nach  $10 \mu\text{M}$  DHE-Zugabe.  $1 \mu\text{M}$  SIN-1 diente als Positivkontrolle. (Repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten; Vergrößerung: 200x).

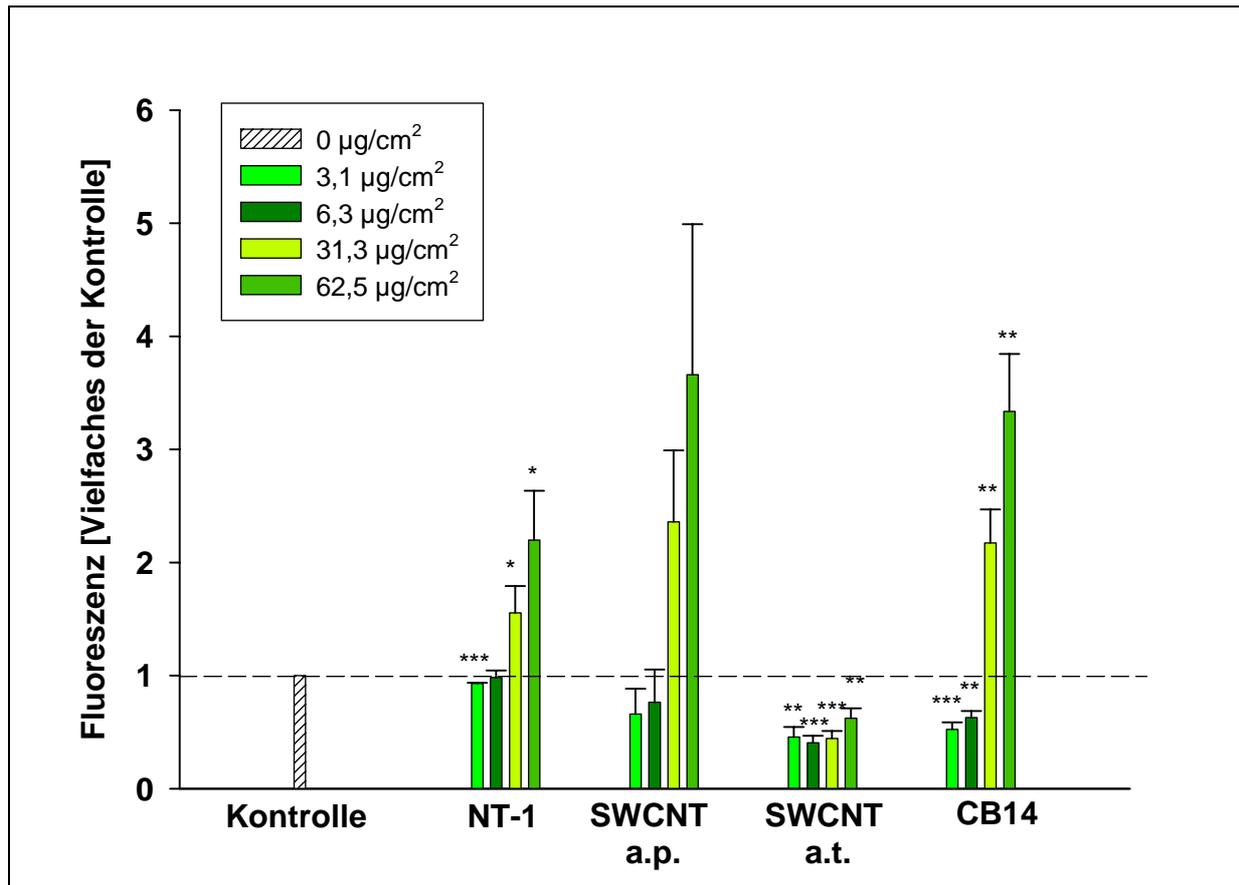
### **4.5.3 Partikel-induzierte ROS-Induktion im zellfreien System durch Kohlenstoff Nanoröhren**

Einige Studien mit Partikeln konnten bisher zeigen, dass es zur ROS-Entstehung auch im zellfreien System kommt (Brown et al., 2001; Stone et al., 2000; Wilson et al., 2002). Der Zusammenhang zwischen der Größe von Partikeln und ihrer Oberfläche wird besonders bei Nanopartikeln deutlich, deren Oberfläche sich mit abnehmendem Verhältnis zu ihrem Volumen enorm vervielfacht. Die Oberfläche ist zum Teil für die große Partikelreaktivität, insbesondere redox-Reaktivität, der Nanopartikel verantwortlich (Koike and Kobayashi, 2006). Für ultrafeines *Carbon Black* (CB14) ist zum Beispiel berichtet worden, dass es auch im zellfreien System zu einer deutlichen Entwicklung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt (Wilson et al., 2002).

Diese Beobachtung sollte für Kohlenstoff Nanoröhren mithilfe des DCF-Tests überprüft werden. Im zellfreien System findet die Aktivierung des H<sub>2</sub>DCF-DA durch Häm-Proteine mit Peroxidase-Aktivität statt (Bonini et al., 2006). Hämoglobin ist z.B. in FCS enthalten (Wagner et al., 2007), welches die Oxidation des DCFH katalysieren kann (Ohashi et al., 2002). Aus diesem Grund wurden 20 µM des Farbstoffs (H<sub>2</sub>DCF-DA) zur Aktivierung in Medium für 20 Minuten bei 37°C vorinkubiert und anschließend die Partikel mit dem aktivierten H<sub>2</sub>DCF für weitere zwei Stunden im Brutschrank behandelt. Schließlich konnten die Partikel abzentrifugiert und der Überstand im Fluoreszenzreader bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission von 530 nm gemessen werden. Die Fluoreszenzmessung der unbehandelten Kontrollen wurde wiederum gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der behandelten Proben als Vielfaches der Kontrolle dargestellt.

In Abb. 4.16 zeigt sich eine deutliche dosis-abhängige Entwicklung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Inkubation mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (3,1 µg/cm<sup>2</sup> – 62,5 µg/cm<sup>2</sup> [5 µg/ml – 100 µg/ml]) von NT-1, SWCNT a.p., SWCNT a.t. sowie CB14. Diese starke ROS-Freisetzung ist mit dem Ergebnis der in Abb.4.10 gezeigten Induktion von Oxidativem Stress in A549 Zellen nach Partikel Inkubation vergleichbar.

Dieses Ergebnis zeigt, dass *Carbon Nanotubes* alleine, auch ohne zusätzliche zelluläre Mechanismen, für einen großen Anteil des gemessenen Oxidativen Stresses verantwortlich sein können. Dass hierbei wiederum die Verunreinigungen der CNTs eine große Rolle spielen, zeigt sich in der hier wiederholt gezeigten fehlenden ROS-Entwicklung durch die aufgereinigten SWCNT a.t.



**Abb. 4.16: ROS-Entwicklung durch Carbon Nanotubes im zellfreien System**

H<sub>2</sub>DCF-DA wurde für 20 Minuten bei 37°C in Medium vorinkubiert, um eine Aktivierung des Farbstoffes zu bewirken. Anschließend konnte das H<sub>2</sub>DCF mit aufsteigenden Konzentrationen (3,1 µg/cm<sup>2</sup> – 62,5 µg/cm<sup>2</sup> [5 µg/ml – 100 µg/ml]) der jeweiligen Partikel für weitere 2h im Brutschrank behandelt, die Fluoreszenz gemessen und quantifiziert werden. Die unbehandelten Kontrollen wurden gleich eins gesetzt und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten ± SEM [\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

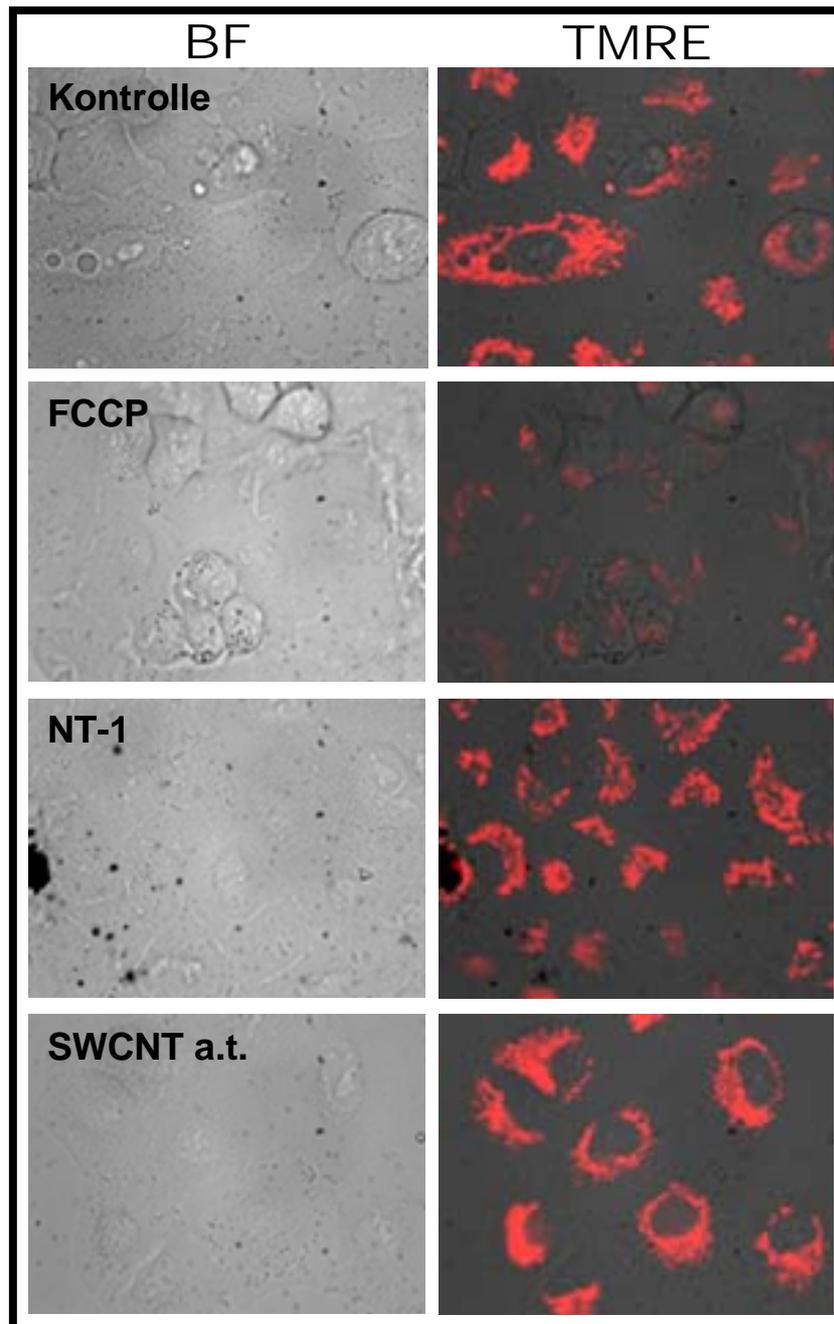
#### **4.6 Keine Änderung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) in humanen Lungenepithelzellen (A549) nach Inkubation mit Kohlenstoff Nanoröhren**

Nachdem nun aufgrund der Ergebnisse des DCF-Tests gezeigt werden konnte, dass Carbon Nanotubes die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren können, sollte im Folgenden mithilfe der TMRE Färbung das Mitochondriale Membran Potential (MMP) ( $\Delta\psi_m$ ) nach Partikelinkubation überprüft werden. Dieser Test kann eine Schädigung der Mitochondrien, aufgrund z.B. von Oxidativem Stress oder durch direkte Partikeleinwirkung nachweisen (Hussain et al., 2005; Li et al., 2003; Long et al., 2006; Shukla et al., 2003).

Die TMRE-Färbung beruht darauf, dass sich der kationische, lipophile Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamine Ethylester (TMRE) bei intaktem mitochondrialen Potential an die innere Mitochondrienmembran anlagert. Die quantitative Messung und Auswertung der Fluoreszenz erfolgte am Durchflusszytometer (FACS) bei einer Anregung von 488 nm und einer Detektion der Rotfluoreszenz in Kanal FL-2 (575 nm). Sind die Mitochondrien geschädigt und verlieren an Potential, kann sich das TMRE nicht mehr an die Membran anlagern und die gemessene Fluoreszenz fällt geringer aus.

Zur weiteren Analyse des *Carbon Nanotube*-induzierten Oxidativen Stresses wurden die zu untersuchenden Partikel-inkubierten Zellen für 30 Minuten mit 0,5  $\mu\text{M}$  TMRE bei 37°C angefärbt und anschließend die Fluoreszenzintensität der einzelnen Ansätze qualitativ bzw. quantitativ ausgewertet.

In Abb. 4.17 ist die Färbung von A549 Zellen mit TMRE dargestellt. Unbehandelte Kontrollen besitzen in der Regel intakte Mitochondrien, welche eine große Menge des Farbstoffs inkorporieren können. Somit können diese Zellen durch ihre starke Rotfluoreszenz eindeutig identifiziert werden. Die einstündige Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon) führte zur Depolarisation der Mitochondrien und somit auch zur Freisetzung von TMRE. Diese Substanz wurde in allen Versuchen als Positivkontrolle verwendet und zur Kalibrierung der durchflusszytometrischen Messung genutzt, ist aber nicht in den quantitativen Messungen wiedergegeben. Die Behandlung der Zellen mit 23,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) *Carbon Nanotubes* zeigte in diesem Experiment im Vergleich zu den beiden Kontrollen keinen offensichtlichen Verlust der Fluoreszenzintensität. Die Inkubation mit den stark verunreinigten NT-1, die zu einer hohen ROS-Freisetzung führte (Abb.4.10), zeigte hier keinen Einfluss auf die mitochondriale Membranintegrität. Auch die Behandlung mit SWCNT a.t. führte zu keiner Beeinträchtigung der Mitochondrien. Die CNT-inkubierten A549 Zellen wiesen nach der Behandlung, ähnlich der unbehandelten Kontrollen, einen hohen Anteil des TMRE Farbstoffes auf.

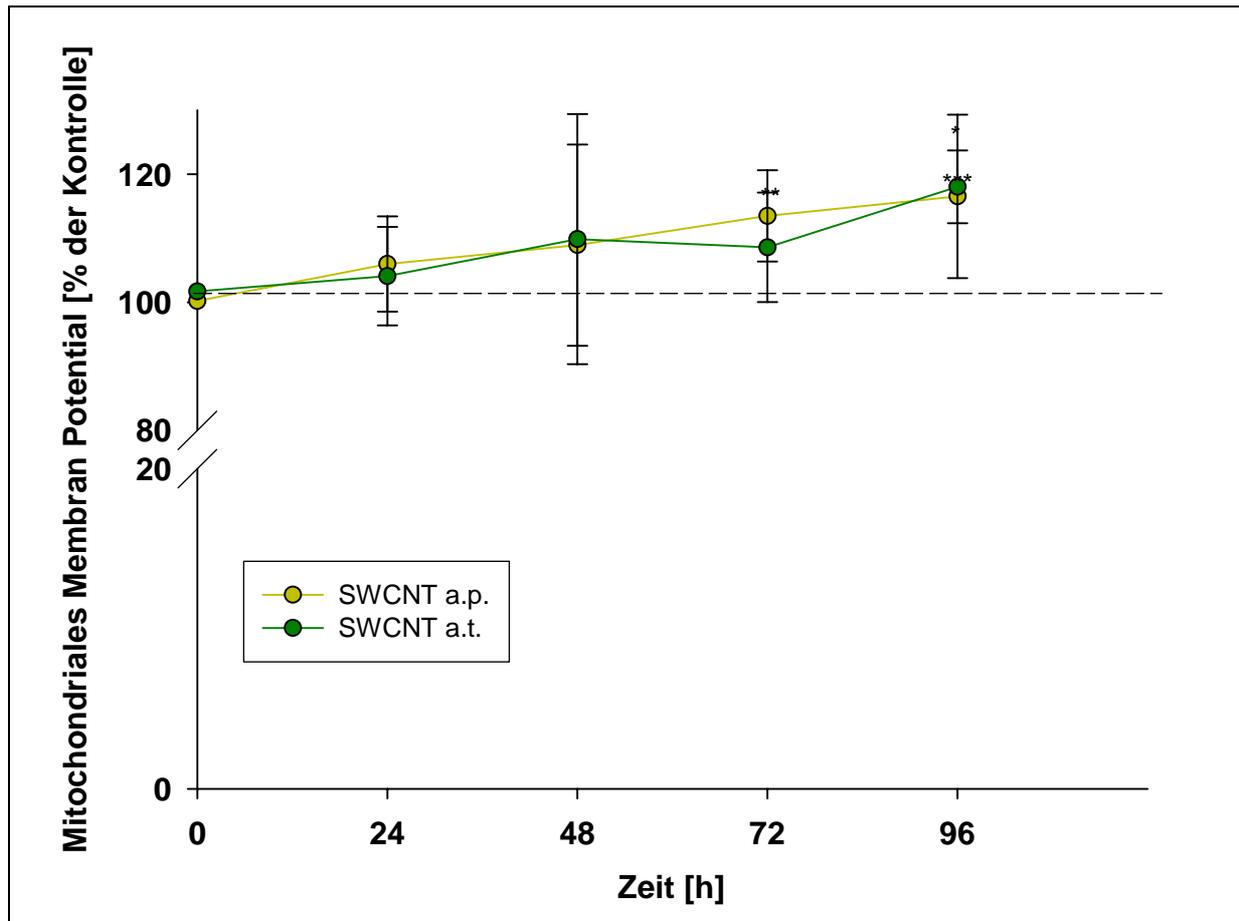


**Abb. 4.17: TMRE Färbung von A549 Zellen zur Ermittlung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) nach Behandlung mit  $23,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) Carbon Nanotubes**

Zur Bestimmung des Mitochondrialen Membranpotentials wurden die Partikel-inkubierten Zellen für 30 Minuten mit  $0,5 \mu\text{M}$  TMRE inkubiert und anschließend die Intensität der Rotfluoreszenz in den Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Unbehandelte Kontrollzellen weisen eine hohe Fluoreszenzintensität auf, da aufgrund des intakten Membranpotentials eine große Menge des Farbstoffs inkorporiert werden konnte. Eine Behandlung der Zellen mit der Substanz FCCP führte zum vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials und zu einem Verlust der Rotfluoreszenz.  $20 \mu\text{M}$  FCCP diente in den Versuchen als Positivkontrolle. (BF: Bright-Field, Hellfeld) (Repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten; Vergrößerung: 630x).

Mithilfe der Durchflusszytometrie kann der relative Verlust der Rotfluoreszenz einer Zellpopulation quantitativ bestimmt und somit Rückschlüsse auf deren mitochondriale Membranintegrität gezogen werden. Zur weiteren Untersuchung eines möglichen CNT-

ausgelösten Verlustes des MMP wurden A549 Zellen für einen Zeitraum von 24 Stunden bis 96 Stunden mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) der DMF-aufgereinigten SWCNT a.p. und den Säure-behandelten SWCNT a.t. inkubiert. Vor Ablauf der Inkubation wurden die Zellen zusätzlich mit  $0,5 \mu\text{M}$  TMRE angefärbt und anschließend mit PBS gewaschen. Die quantitative Analyse der durchflusszytometrischen Messung ist in Abb. 4.18 gezeigt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt, die als 100% vital eingestuft wurde. Abb. 4.18 bestätigt die im Fluoreszenzmikroskop beobachteten Ergebnisse, dass es bei den CNT-inkubierten Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Abnahme der Rotfluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegeben hat, was wiederum eine fehlende Depolarisation bzw. Schädigung der mitochondrialen Membranintegrität durch *Carbon Nanotubes* vermuten lässt. Diese Untersuchung bestätigte weiterhin die in Abb. 4.17 gezeigte Beobachtung, dass die Art und Menge der unterschiedlichen CNT-Verunreinigungen keinen Einfluss auf das MMP der Zellen in einem Zeitraum von bis zu vier Tagen ausüben. Weder die DMF-aufgereinigten SWCNT a.p., die nach 24h einen deutlichen ROS-Anstieg gezeigt hatten (Abb.4.10) noch die Säure-behandelten SWCNT a.t. wiesen einen Unterschied in der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Negativkontrolle auf.



**Abb. 4.18: Zeitlicher Verlauf der Veränderung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) in A549 Zellen nach Carbon Nanotube Inkubation**

Dargestellt ist die durchflusszytometrisch gemessene Veränderung des MMP gemessen mit der TMRE Färbung nach Inkubation von A549 Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) SWCNT a.p. und SWCNT a.t. nach 24h - 96h. Die Werte sind als % der Kontrolle dargestellt, die als 100% vital gesetzt wurde. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

#### **4.7 Einfluss von Kohlenstoff Nanoröhren auf inflammatorische Signalwege – der $\text{NF}\kappa\text{B}$ Signalweg**

Da bereits in den vorangegangenen Experimenten ein Einfluss verschiedener Nanotubes auf die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in A549 Zellen aufgrund der Ergebnisse in Kapitel 4.5 offensichtlich vorhanden war, galt es nun herauszufinden, ob und auf welcher Ebene die Partikel in die Regulation von inflammatorischen Signalwegen eingreifen können und welche Rolle *Carbon Nanotubes* vielleicht selbst bzw. die CNT-induzierte Freisetzung von ROS dabei spielen.

Von Fein-, Ultrafein- und Feinststäuben sowie Kohlenstoff Nanostrukturen ist bekannt, dass sie sowohl Oxidativen Stress als auch Cytokinausschüttungen, z.B. von  $\text{TNF-}\alpha$  induzieren können (Adelmann et al., 1994; Castranova et al., 2001; Diabaté et al., 2002;

Fujii et al., 2001; Shvedova et al., 2003; Shvedova et al., 2005; van Eeden et al., 2001). Weiterhin ist bekannt, dass Oxidativer Stress viele verschiedene intrazelluläre Schutz- und Entzündungsmechanismen auslösen kann (Rahman, 2002).

NFκB ist ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, der durch verschiedene oxidative Stimulanzen aktiviert werden kann und die Expression einer Reihe von Chemokinen, Cytokinen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren reguliert (Chen et al., 1999).

Aus diesem Grund und den bisher gewonnenen Ergebnissen der CNT-induzierten ROS Freisetzung (Abb.4.10) wurde der NFκB-Weg in der vorliegenden Arbeit für eine nähere Untersuchung ausgewählt. Hierzu erfolgte zunächst die Überprüfung einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und somit dessen Translokation in den Kern mithilfe des Western Blots. Für die folgende Versuchsreihe wurden Endothel-ähnliche Zellen, die ECV304, verwendet, da A549 Zellen im unstimulierten Zustand schon ein hohes basales Level von p65 im Kern aufweisen, so dass eine Verschiebung der Translokation nur sehr schwer nachzuweisen ist und deshalb A549 Zellen für diese Versuchsreihe ungeeignet sind (Chen et al., 2004; Malhotra et al., 2001).

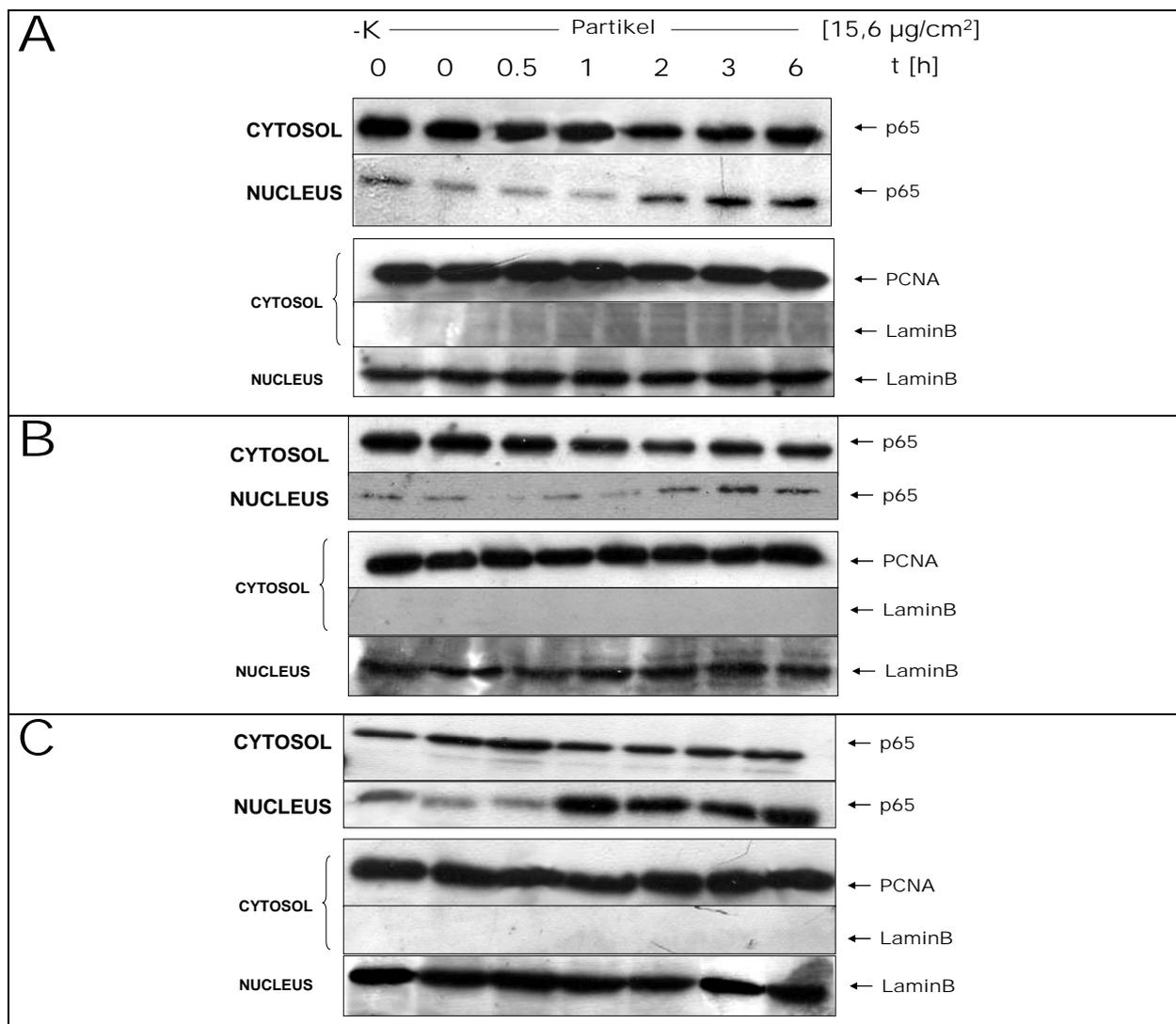
#### **4.7.1 Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB nach Kohlenstoff Nanoröhren Exposition**

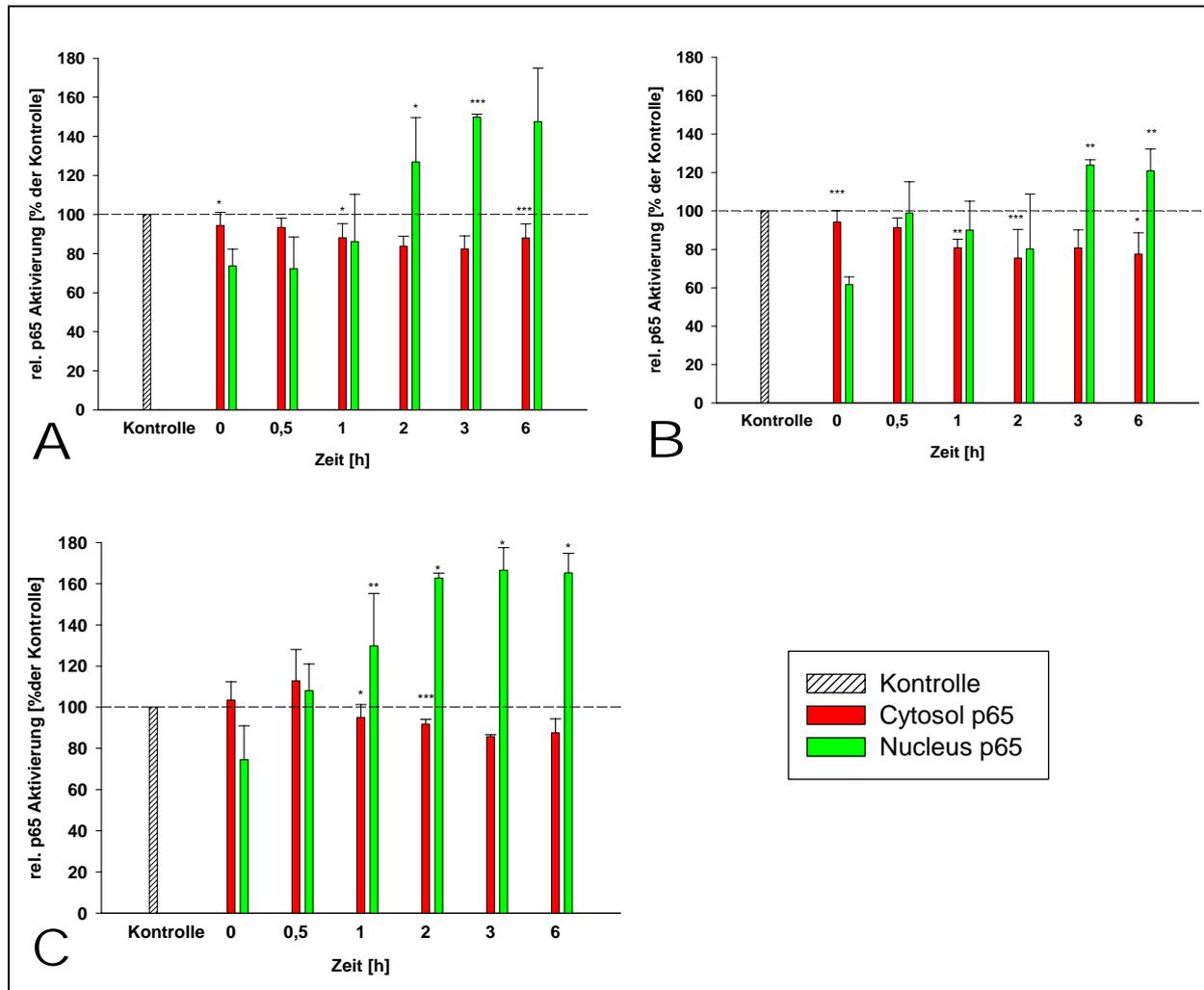
Für die Durchführung dieses Versuches wurden ECV304 Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 30 Minuten, 1h, 2h, 3h und 6h mit NT-1, SWCNT a.t. und CB14 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation und gründlichem Waschen des Zellrasens konnten die Zellen geerntet und die cytoplasmatischen Proteine von den Kernproteinen getrennt werden. Anschließend wurden die Proteinfractionen elektrophoretisch mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch nachgewiesen. Die Bandenintensität wurde zusätzlich mithilfe der Software Odyssey 2.0 quantitativ ausgewertet und die Ergebnisse als relative p65 Aktivität in Prozent der unbehandelten Kontrolle, welche auf 100% gesetzt wurde, errechnet und dargestellt.

In Abb. 4.19 ist die zeitabhängige Aktivierung und Translokation von p65 in den Kern nach *Carbon Nanotube* und *Carbon Black* Behandlung der ECV304 Zellen dargestellt. Alle Partikel-behandelten Zellen, unabhängig vom jeweiligen Material, Art und Menge der Verunreinigung, weisen im Cytosol eine leichte, aber stetige Abnahme der p65 Konzentration auf. Gleichzeitig kann man ab dem 1h- bzw. 2h Zeitpunkt eine Zunahme

von p65 im Kern, ebenfalls unabhängig von den eingesetzten Partikeln, finden. Im Vergleich zu den NT-1 und CB14 behandelten Zellen wiesen die aufgereinigten SWCNT a.t. behandelten Zellen jedoch einen nur sehr geringfügigen Anstieg von p65 im Kern auf, was darauf hindeutet, dass es unterschiedliche Mechanismen in der Aktivierung von p65 innerhalb der unterschiedlichen Materialien geben kann.

PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“) wurde als Ladekontrolle der cytoplasmatischen Fraktion und Lamin B, ein Intermediärfilamentprotein des Kerns als Ladekontrolle des Kernlysats, sowie zur Überprüfung der sauberen Trennung von Kern- und Cytoplasmaproteinen, verwendet. Hierbei wurde sichergestellt, dass in der cytosolischen Fraktion kein Lamin B nachzuweisen war.





**Abb. 4.19: Translokation von p65 in den Kern nach *Carbon Nanotube* Behandlung: (A) NT-1 (B) SWCNT a.t. (C) CB14**

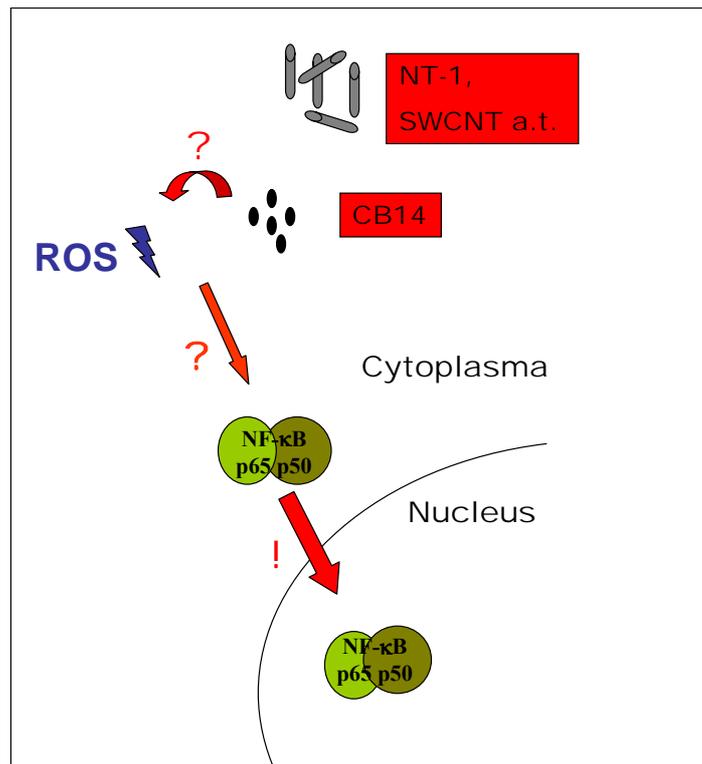
ECV304 Zellen wurden mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) NT-1, SWCNT a.t. und CB14 in einem Zeitraum von 30 Minuten, 1h, 2h, 3h und 6h behandelt. Anschließend wurde mithilfe des Western Blots die Aktivierung und Translokation von p65 in den Kern untersucht. Die dargestellten Blots zeigen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen. Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte mithilfe der Software Odyssey 2.0 und die Ergebnisse der relativen p65 Aktivierung wurden als Prozent der unbehandelten Kontrolle (100%) graphisch dargestellt. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

In Kapitel 4.5 konnte eindeutig gezeigt werden, dass Kohlenstoff Nanoröhren reaktive Sauerstoffspezies induzieren können und somit zu erhöhtem Oxidativen Stress beitragen. Die Art und Menge der Verunreinigungen spielen dabei eine wichtige Rolle und führen u.a. auch zu zeitlichen Unterschieden in der gemessenen ROS-Freisetzung. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass *Carbon Nanotubes* auch selbst, im zellfreien System, ROS katalysieren können.

Anhaltender Oxidativer Stress kann Stress-abhängige Kinasen aktivieren und zur Translokation von NF $\kappa$ B in den Kern führen (Chan and Murphy, 2003; Gloire et al., 2006; Jaspers et al., 2001; Rahman, 2002; Ryan et al., 2004; Yin et al., 2000; Zhou et al., 2003). Außerdem ist beschrieben, dass anthropogene Partikel aus Industrieanlagen in humanen

Lungenzellen zu einer Aktivierung von NFκB, in Abhängigkeit von Oxidativem Stress, führen (Chung et al., 2007; Dye et al., 1999; Kennedy et al., 1998; Quay et al., 1998; Shukla et al., 2000). Diese Ergebnisse lassen deshalb vermuten, dass in der Partikel-induzierten NFκB Aktivierung reaktive Sauerstoffradikale eine große Rolle spielen können.

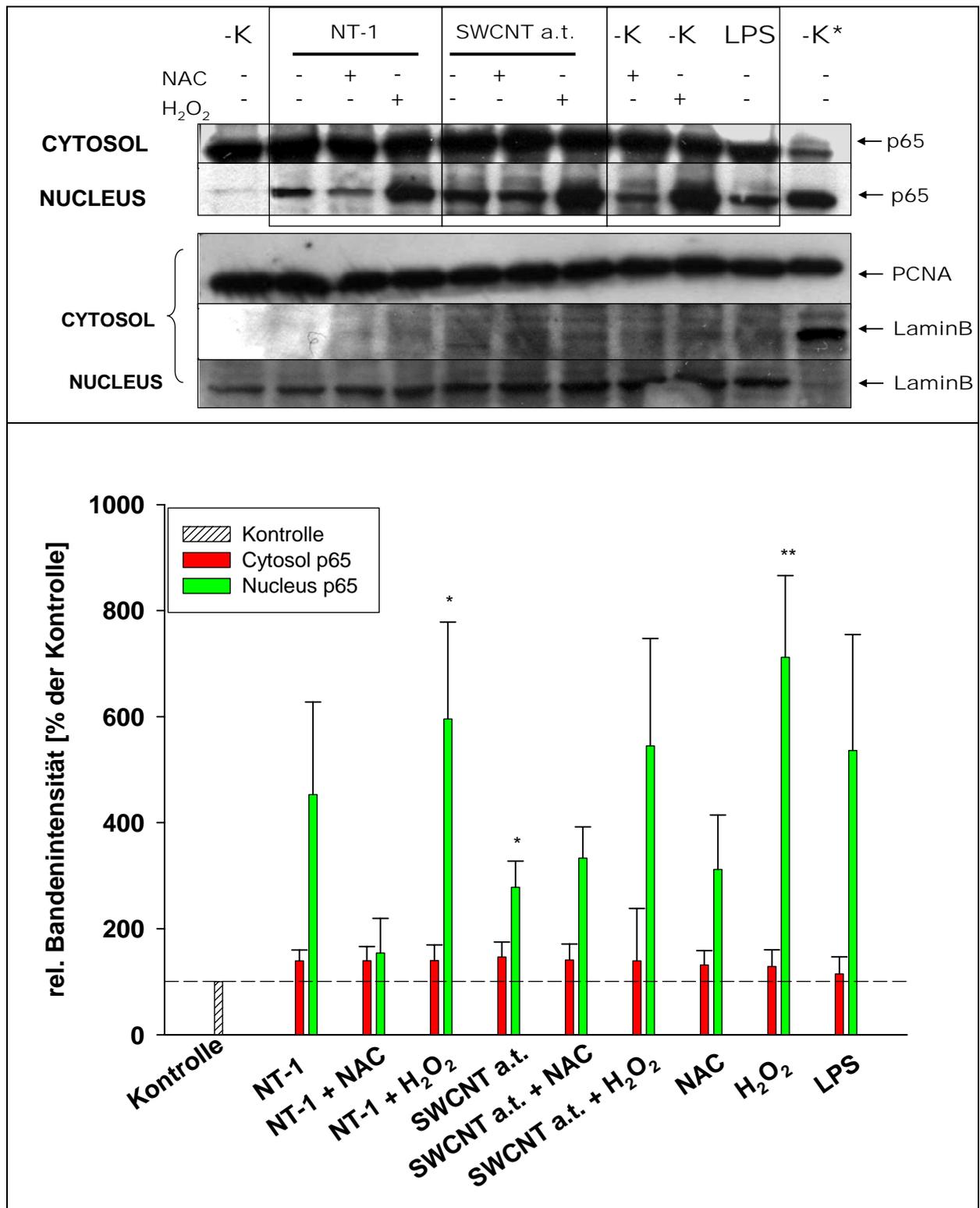
Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob die beobachtete Translokation von p65 in den Kern aufgrund der, wie schematisch in Abb.4.20 dargestellt, CNT-induzierten ROS-Freisetzung ausgelöst und beeinflusst wird. Hierfür wurden wiederum ECV304 Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) NT-1 und SWCNT a.t. für drei Stunden behandelt. Gleichzeitig wurde bei jeweils einer Charge der Ansätze  $10 \text{ mM}$  des Antioxidanz N-acetyl-L-cystein (NAC) zugegeben, um den Einfluss von ROS auf die p65 Aktivierung nachzuweisen. Eine einstündige Behandlung der Zellen mit  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS (Lipopolysaccharid), einem Bestandteil der Membran gramnegativer Bakterien, wurde in diesem Versuch als Positivkontrolle verwendet (Chan and Murphy, 2003; Chow et al., 1999; Dauphinee and Karsan, 2006; Faure et al., 2000). Nach anschließendem Ernten der Zellen sowie der Trennung der cytoplasmatischen Fraktion und des Kernproteinlysats wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um die Translokation von p65 zu überprüfen. Die Bandenintensität wurde zusätzlich mithilfe der Software Odyssey 2.0 quantitativ ausgewertet und die Ergebnisse als relative Bandenintensität in Prozent der unbehandelten Kontrolle, berechnet und dargestellt, welche auf 100% gesetzt wurde.



**Abb.4.20: Schematische Darstellung der möglichen ROS-induzierten p65 Translokation in den Kern nach Partikel-Behandlung**

Die Western Blot Analyse in Abb. 4.21 zeigt die Translokation von p65 in den Kern nach Behandlung von ECV304 Zellen mit *Carbon Nanotubes* mit und ohne Co-Inkubation des Antioxidanz NAC. Das Ergebnis zeigt zum einen, dass eine Behandlung der Zellen sowohl mit  $H_2O_2$  als auch mit LPS zu einer Aktivierung von p65 in diesen Zellen geführt hat. Zum anderen führte, wie schon in Abb. 4.19 dargestellt, eine dreistündige Inkubation der Zellen mit NT-1 zu einer deutlichen Translokation von p65. Wie weiterhin gezeigt, führte die gleichzeitige Zugabe von NAC tatsächlich zu einer Reduktion der Menge an p65 im Kern, während die Co-Inkubation von  $H_2O_2$  und NT-1 die Translokation sogar noch verstärkte. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Freisetzung von ROS bei der NT-1-induzierten Aktivierung des NFκB-Signalweges eine bedeutende Rolle spielt.

Die Inkubation der Zellen mit SWCNT a.t. führte ebenfalls zu einer geringen p65 Translokation, die jedoch durch Co-Inkubation mit NAC nicht reduziert werden konnte. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass es noch weitere Mechanismen der CNT-induzierten p65 Aktivierung geben muss. Die Zugabe von  $H_2O_2$  in Verbindung mit SWCNT a.t. führte ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinmenge von p65 im Kern.



**Abb. 4.21: Aktivierung von p65 nach Co-Inkubation von Carbon Nanotubes und NAC**

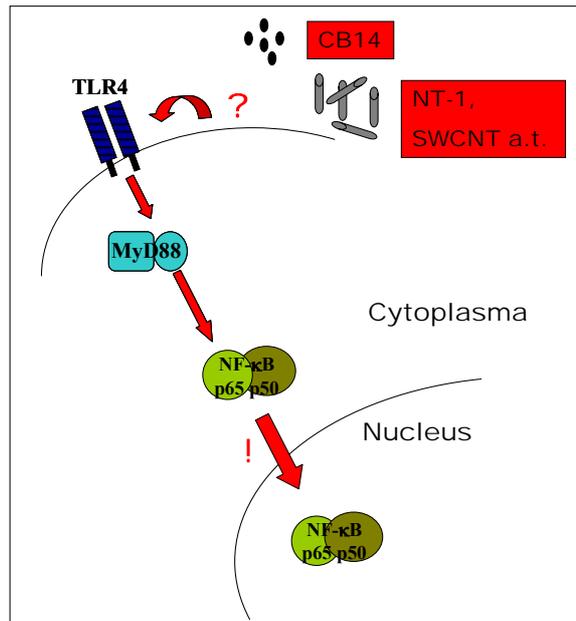
ECV304 Zellen wurden für 3h mit 15,6 µg/cm<sup>2</sup> (50 µg/ml) NT-1, SWCNT a.t. sowie mit 10 mM des Antioxidanz NAC oder 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und anschließend mithilfe des Western Blots auf die Aktivierung und Translokation von p65 in den Kern untersucht. 10 µg/ml LPS wurde hier als Positivkontrolle verwendet. K\* stellt die umgekehrt aufgetragene Fraktion der unbehandelten Kontrolle dar (Cytosol = Kernfraktion; Nucleus = Cytosolfraction). Die dargestellten Blots zeigen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen. Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte mithilfe der Software Odyssey 2.0 und die Ergebnisse der relativen p65 Aktivierung wurden als Prozent der unbehandelten Kontrolle (100%) graphisch dargestellt. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten ± SEM [\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

In diesen Versuchen konnte somit gezeigt werden, dass es zu einer nachweisbaren Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges nach *Carbon Nanotube* Behandlung von Endothel-ähnlichen ECV304 Zellen kommt (Abb. 4.19). Weiterhin wurde der Einfluss von ROS bei dieser Aktivierung mithilfe der Co-Inkubation von NAC und NT-1 nachgewiesen. Allerdings ist offensichtlich, dass es weitere Mechanismen für die Aktivierung von p65 zu geben scheint, da die aufgereinigten SWCNT a.t., die keine ROS freisetzen, ebenfalls eine p65 Translokation induzieren, die durch NAC nicht reduziert werden konnte.

Dieses Ergebnis der NF $\kappa$ B-Aktivierung forderte dazu heraus, genauer zu studieren, auf welcher Ebene in der Signalkaskade diese Aktivierung von p65 durch CNTs stattfindet und ob sich die verwendeten CNT-Materialien hier ebenfalls unterscheiden. Eine Möglichkeit der NF $\kappa$ B-Induktion ist die Rezeptorebene und hier insbesondere die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). TLRs gehören zur Familie der integralen Typ-I Transmembranproteine, die durch extrazelluläre Leucin-reiche Wiederholungsmotive und eine cytoplasmatische Signaldomäne charakterisiert sind, die homolog zu der des Interleukin-1-Rezeptors ist (TIR Domäne). Sie erkennen ein weites Spektrum an exogenen und endogenen Liganden, wie z.B. LPS und stellen somit eine der immunologisch wichtigsten Rezeptorfamilien dar. Die Stimulation unterschiedlicher TLRs durch Liganden induziert Antwortprofile, welche sich durch die Nutzung der verschiedenen Adaptormoleküle regulieren lassen. MyD88 stellt dabei das wichtigste Adaptormolekül dar, welches Teil der TLR4-vermittelten NF $\kappa$ B-Signalkaskadenaktivierung ist.

Die Exposition von Lungenzellen mit PM und Metalloxid-Nanopartikeln führt zu einer veränderten Expression von TLR4 und TLR2 und könnte darauf hinweisen, dass TLRs einen bedeutenden Einfluss auf die Partikel-induzierte inflammatorische Antwort ausüben könnten (Becker et al., 2005; Becker et al., 2005; Lucarelli et al., 2004). Insbesondere der TLR4 Rezeptor scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Cho et al., 2005; Inoue et al., 2006).

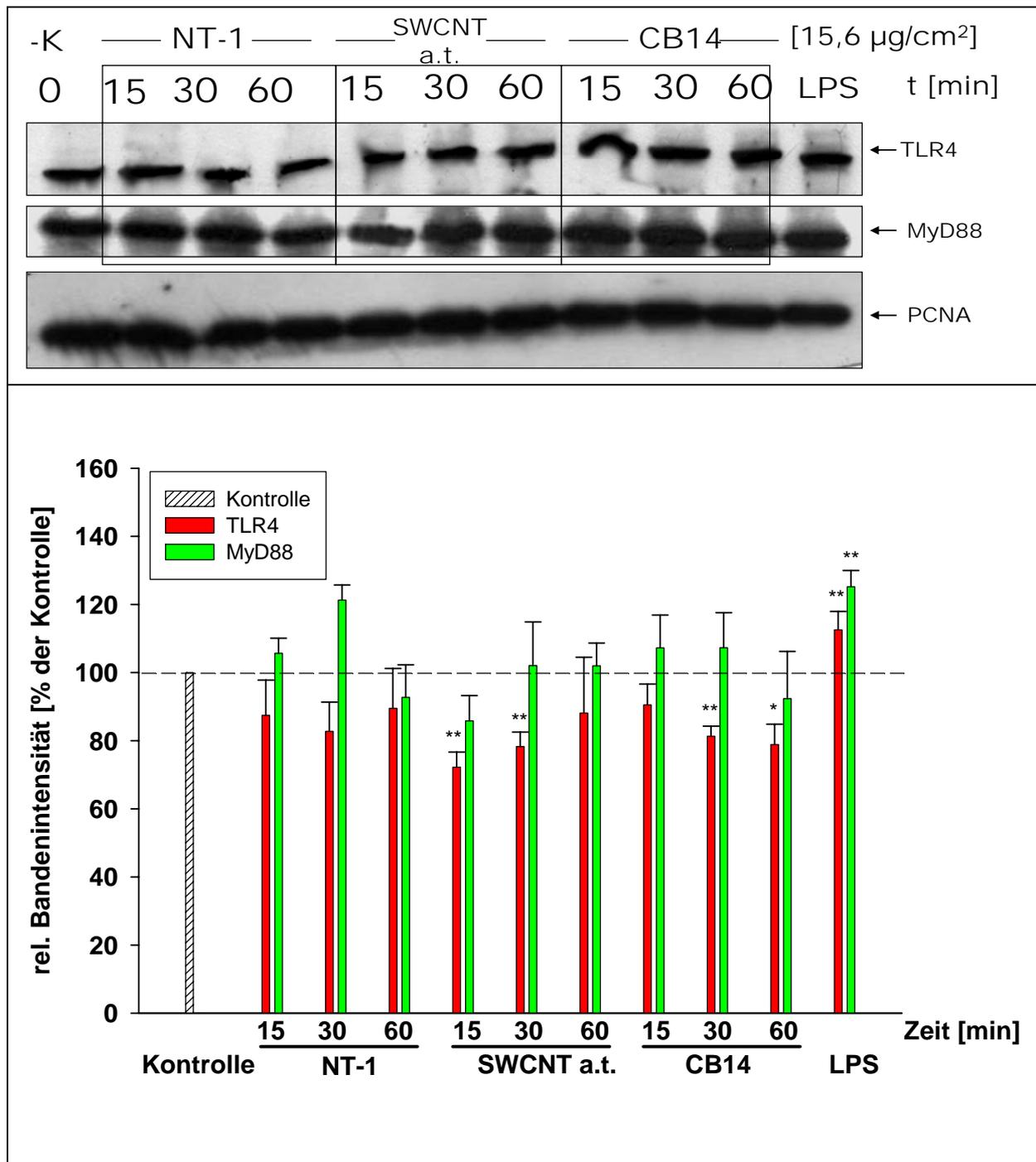
Eine mögliche Aktivierung von p65 durch *Carbon Nanotubes* über die Toll-like-Rezeptoren ist schematisch in Abb. 4.22 dargestellt.



**Abb. 4.22:** Schematische Darstellung einer möglichen Interaktion von Partikeln mit dem TLR4 Rezeptor und der Aktivierung des NFκB-Signalweges über das Adaptorprotein MyD88

Diese Möglichkeit der TLR4-vermittelten und MyD88-abhängigen NFκB-Signalkaskadenaktivierung durch Behandlung der Zellen mit Partikeln wurde mithilfe der Western Blot Untersuchung durchgeführt. Hierfür wurden ECV304 Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) NT-1, SWCNT a.t. sowie CB14 für entweder 15 Minuten, 30 Minuten oder 60 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Behandlung wurden die Zellen wiederum gründlich gewaschen, um Reste der Partikel zu entfernen. Anschließend konnten die Zellen geerntet und Ganzzellproteinextrakte daraus gewonnen werden, da hier keine Trennung von Kern- und Cytoplasmaproteinen notwendig war. Zellen mit einer einstündigen Behandlung von  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS, ein Ligand für den TLR4 Rezeptor, wurden in diesem Versuch als Positivkontrolle eingesetzt (Dauphinee and Karsan, 2006). Die Bandenintensität wurde zusätzlich mithilfe der Software Odyssey 2.0 quantitativ ausgewertet und die Ergebnisse als relative Bandenintensität in Prozent der unbehandelten Kontrolle, die 100% gesetzt war, berechnet und dargestellt.

Das Ergebnis des Western Blots in Abb. 4.23 zeigt jedoch, dass keiner der eingesetzten Partikel eine offensichtliche Veränderung in der Proteinexpression von TLR4 und MyD88, nach bis zu einer Stunde Inkubationszeit induzieren konnte. Es wurden vereinzelt leichte Schwankungen in der TLR4- und MyD88-Proteinkonzentration beobachtet, die aber statistisch nicht signifikant waren. Auch längere Inkubationszeiten von 2h, 3h, 6h, 12h und 24h führten zu keiner Veränderung in der Proteinexpression von sowohl TLR4 als auch MyD88 (Daten nicht gezeigt).

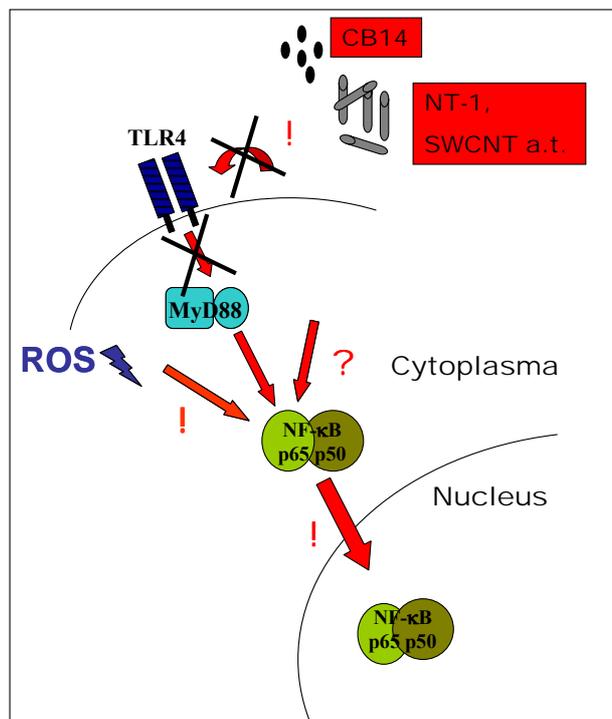


**Abb. 4.23: Western Blot Analysen von TLR4 und MyD88 nach Carbon Nanotube Inkubation**

ECV304 Zellen wurden mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) NT-1, SWCNT a.t. und CB14 in einem Zeitraum von 15min, 30min und 60min behandelt und anschließend mithilfe des Western Blots die Proteinmenge von TLR4 und MyD88 untersucht. Eine einstündige Behandlung der Zellen mit  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPS wurde als Positivkontrolle verwendet. Die dargestellten Blots zeigen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen. Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte mithilfe der Software Odyssey 2.0 und die Ergebnisse der relativen Proteinmenge wurden als Prozent der unbehandelten Kontrolle (100%) graphisch dargestellt. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse in Kapitel 4.7.1 festgestellt werden, dass Kohlenstoff Nanoröhren eine zeitabhängige Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges über die Translokation von p65 in den Kern initiieren. Der Nachweis, dass der, durch die CNT-

Verunreinigungen ausgelöste, Oxidative Stress eine wichtige Rolle spielt, gibt einen weiteren Hinweis auf die ROS-induzierenden Eigenschaften und das damit verbundene indirekte cytotoxische Potential von *Carbon Nanotubes*. Weiterhin wurde durch diese Untersuchungen offensichtlich, dass es auch durch aufgereinigte CNTs, die keine ROS-induzieren, zu einer abgeschwächten Form der Aktivierung des inflammatorischen Signalweges kommen kann. Wie genau es zu dieser Aktivierung durch CNTs kommt und auf welcher Ebene die Nanoröhren direkt bzw. die CNT-induzierten ROS die Signalkaskade beeinflussen, muss weiterhin geklärt werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte jedoch gezeigt werden, dass eine MyD88-abhängige Aktivierung des NFκB-Signalweges durch CNTs auf der Ebene des TLR4 Rezeptors unwahrscheinlich ist (Abb. 4.24).



**Abb. 4.24:** Zusammenfassende schematische Darstellung der Aktivierung des NFκB-Signalweges durch *Carbon Nanotubes*

#### **4.8 Entstehung von CNT-Zell-Agglomeraten, Aktin Stressfasern und „Focal Adhesions“ in humanen Lungenepithelzellen nach Behandlung mit Kohlenstoff Nanoröhren**

In den vorausgegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass *Carbon Nanotubes* nach Aufnahme in Lungenepithel- sowie Endothel-ähnlichen Zellen keine akut cytotoxischen Eigenschaften aufweisen, allerdings Vorsicht geboten sein muss bei der Verwendung dieser Nanopartikel in etablierten Testsystemen, da es hier wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, zu Interaktionen und Verfälschungen der Ergebnisse kommen kann. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass CNTs die Bildung von ROS auslösen, welche in Abhängigkeit der Art und Menge der Verunreinigungen dosis- und zeitabhängig induziert werden (Kapitel 4.5). Ebenso scheint die Beeinflussung inflammatorischer Signalwege, wie z.B. die Aktivierung von NFκB, im engen Zusammenhang mit der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies durch verunreinigte *Carbon Nanotubes* zu stehen. Aufgrund dieser bisher beschriebenen Ergebnisse liegt die Schlussfolgerung nahe, dass aufgereinigte bzw. funktionalisierte Kohlenstoff Nanoröhren (SWCNT a.t., fSWCNT) im Vergleich zu verunreinigten CNT-Materialien (NT-1, SWCNT a.p.) kein akut toxikologisches Potential aufweisen.

Diese Annahme wurde jedoch durch die zuvor beschriebenen lichtmikroskopischen Beobachtungen von A549 Zellen nach CNT-Behandlung in Frage gestellt (Kapitel 4.2). Nach 24 Stunden Inkubation mit NT-1, SWCNT a.p. und SWCNT a.t. konnten morphologische Veränderungen in der Zellkultur in Form von CNT-Zell-Agglomeraten mit einer auffälligen Akkumulation von Zellen an Nanotube-Bündeln beobachtet werden (Abb. 4.3). Ausgenommen hiervon waren die fSWCNT- sowie CB14-behandelten Zellen, die diese Veränderungen nicht aufwiesen. Dieser Hinweis auf Veränderung des Zellverhaltens nach CNT-Inkubation wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops genauer untersucht.

Hierfür wurden A549 Zellen in „*chamber slides*“ ausgesät und für 24 Stunden mit  $23,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) SWCNT a.t. behandelt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mithilfe von Paraformaldehyd auf Eis fixiert und die Membran mit einem PBS/Triton-X 100 Gemisch permeabilisiert. Das Blockieren erfolgte mit BSA bzw. polyklonalem „Mouse/Rabbit“ Serum, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Für die spezifische Untersuchung der CNT-Zell-Formationen wurde das Aktin Cytoskelett mit Rhodamine Phalloidin (rot) angefärbt sowie Vinculin, ein Protein der

„*Focal Adhesion*“ Signalkette, durch Immunfärbung mit einem Alexa-488 nm-gekoppelten Antikörper markiert (grün) und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Weiterhin wurden optische Querschnitte der Zellen im Abstand von 0,3 µm angefertigt (z-step) und die einzelnen Ebenen mithilfe der Improvisation Volocity 4 Software digital für eine virtuelle 3D-Darstellung der Zellen bearbeitet.

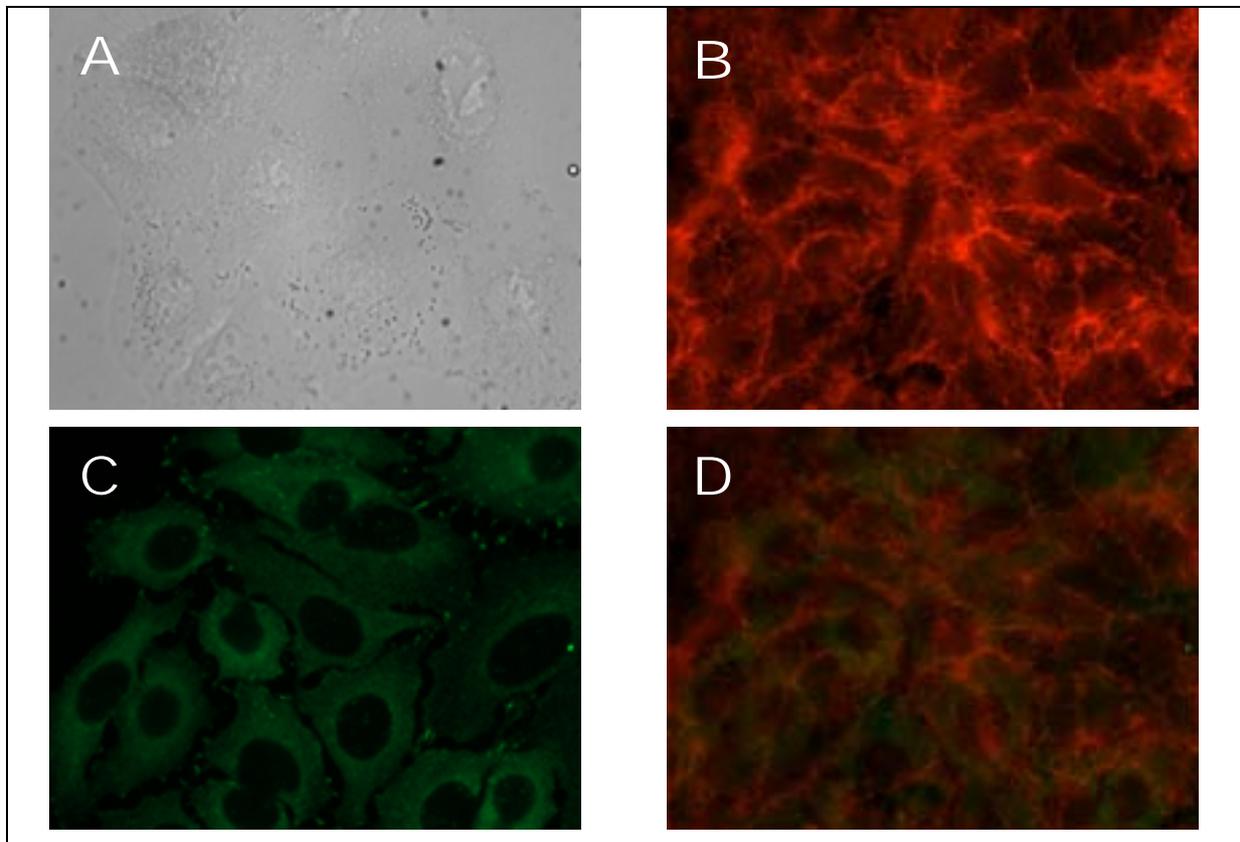
Fokale Adhäsionspunkte der Zelle, so genannte „*Focal Adhesions*“, sind dynamische molekulare Komplexe, die zusammen mit der Familie der Integrinrezeptoren das Aktin Cytoskelett mit der extrazellulären Matrix (EZM) verbinden. Die extrazelluläre Domäne der Integrine bindet an Bestandteile der EZM, z.B. Fibronectin und Laminin, während die cytoplasmatische Einheit in Verbindung mit dem Aktin Cytoskelett sowie spezifischen Proteinen, wie z.B. Vinculin, Talin und Paxillin, steht. Die Interaktion der EZM mit Integrinrezeptoren spielt aber nicht nur bei der Zelladhäsion eine wichtige Rolle, sondern wird ebenso mit der Regulierung verschiedener Zielgene, die verantwortlich sind für Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod, in Verbindung gebracht. Nach Integrinaktivierung werden zum einen Integrin-bindende Proteine, z.B. Talin und zum anderen Adaptorproteine, z.B. Paxillin und Vinculin sowie Enzyme, z.B. FAK und Src, an den Rezeptor rekrutiert.

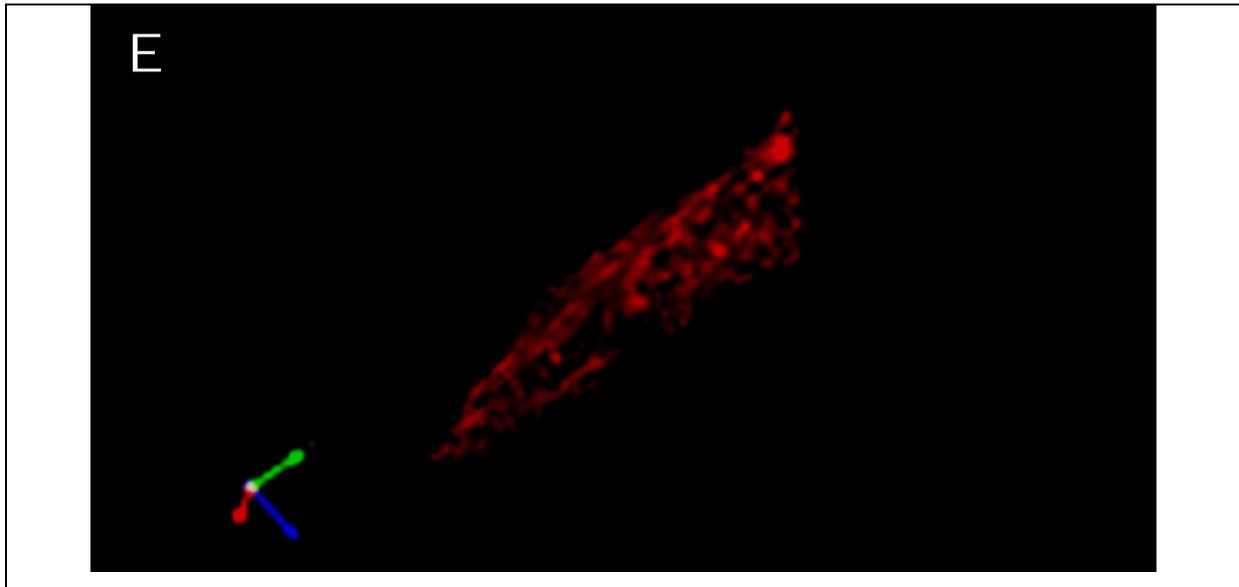
Es ist bekannt, dass Veränderungen der EZM-Integrin Interaktion zu einer Umgestaltung der zellulären Morphologie sowie des Zellverhaltens führen (Chen et al., 1997; Folkman and Moscona, 1978; Roskelley et al., 1994). Des Weiteren konnten bisherige Studien zeigen, dass die Topographie des Materials dabei u.a. das Ausrichtungs- und Migrationsverhalten der Zelle bestimmt (Sinha et al., 1994). Unterschiede in zellulären Prozessen sowie morphologische Umgestaltung von Zellen in zwei- bzw. dreidimensionalen Kollagen Substraten wurden ebenfalls mehrfach beobachtet und beschrieben (Cukierman et al., 2002; Geiger et al., 2001; Ishii et al., 2001; Ravanti et al., 1999).

Zunächst wurden unbehandelte Kontrollzellen als Vergleich fluoreszenzmikroskopisch untersucht, die diese morphologischen Zellveränderungen nicht aufwiesen.

Die in Abb. 4.25 dargestellten Fluoreszenzbilder der unbehandelten Kontrollen weisen auf den ersten Blick eine diffuse Verteilung von Aktin (rot) und Vinculin (grün) auf, wobei Aktin hauptsächlich in der Peripherie der Zellen nachzuweisen ist (Abb. 4.25 (B)).

A549 sind adhärenente Zellen, die sich mithilfe von „*Focal Adhesions*“ an den Untergrund anheften. Diese Adhäsionspunkte zeichnen sich durch eine Anhäufung der „*Focal Adhesion*“ Proteine, u.a. Vinculin in den Spitzen dieser Zellausläufer aus. Dies ist in (Abb. 4.25 (C)) deutlich in Form von grün fluoreszierenden Punkten zu sehen. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung konnte somit keine Auffälligkeiten in der Zellmorphologie und im Adhäsionsverhalten der unbehandelten Kontrollzellen feststellen. Ein virtueller Querschnitt durch den Zellrasen ist in Abb. 4.25 (E) dargestellt, welcher mittels eines z-steps mit 0,3  $\mu\text{m}$  Schritten angefertigt, und die Bilder virtuell mit einem 3D-Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet wurden. Auch hier zeigt sich keine besondere morphologische Auffälligkeit der Kontrollzellen.

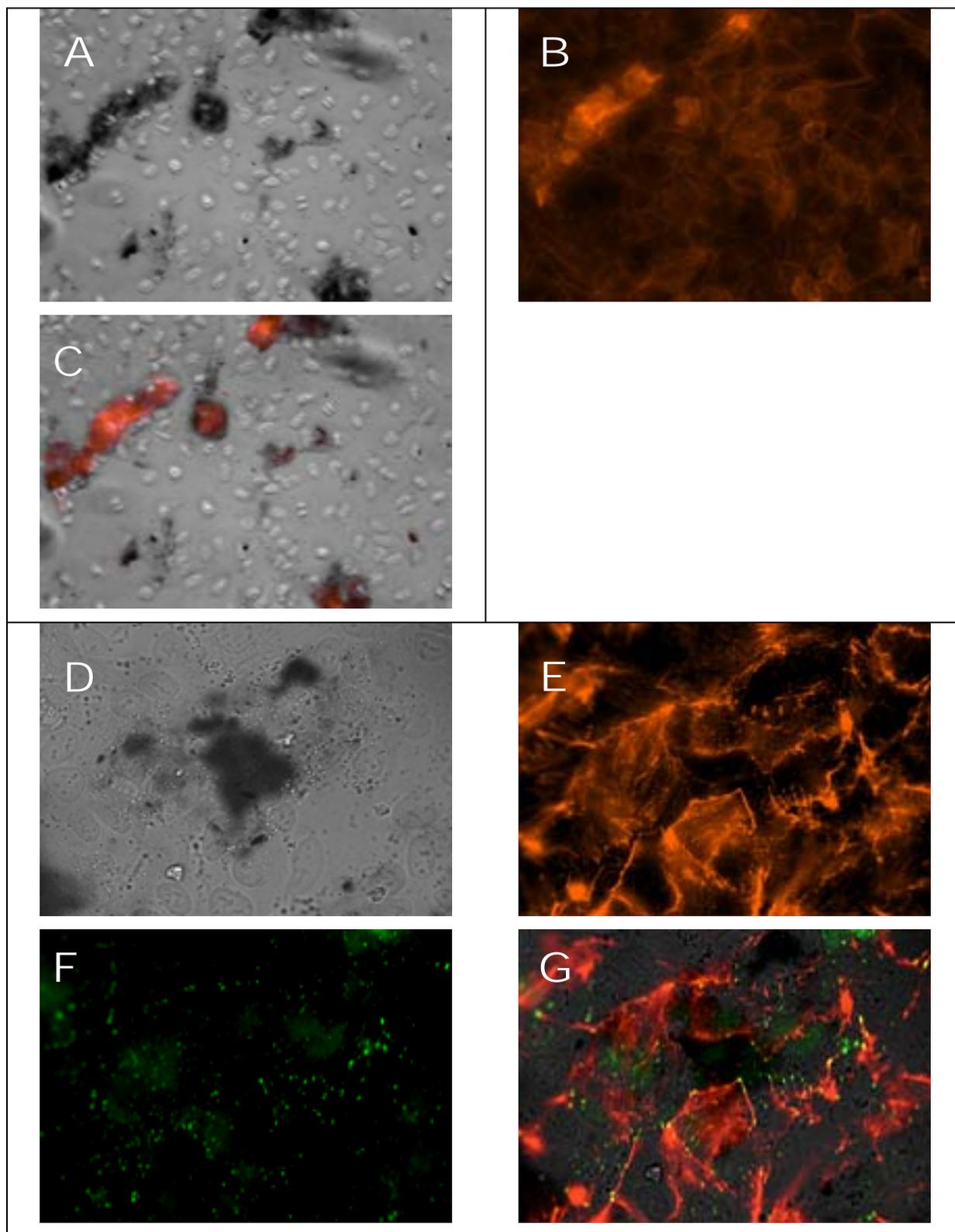


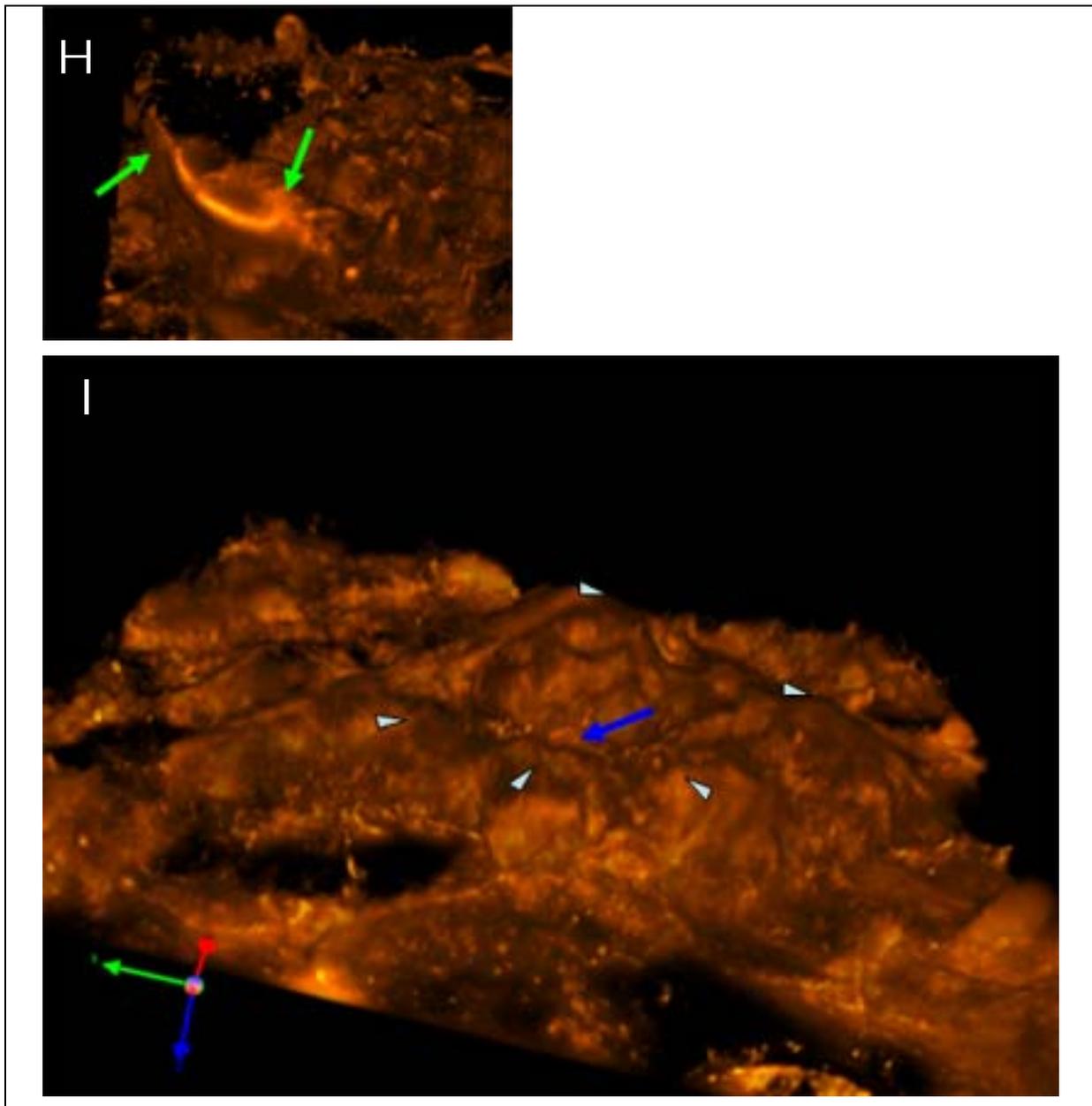


**Abb. 4.25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten A549 Kontrollzellen**

Für die Untersuchung des Aktin Cytoskeletts und der „Focal Adhesion“ Signalkette wurden A549 Zellen fixiert und spezifisch für die Fluoreszenzmikroskopie gefärbt. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (B) Rhodamine Phalloidin Färbung des Aktin Cytoskeletts (C) Vinculin-Alexa-488 nm Immunfärbung (D) Overlay (E) virtueller Querschnitt eines z-step (0,3 µm) nach einer 3D-Bildbearbeitung mithilfe der Improvision Volocity 4 Software. Die dargestellten Bilder stellen repräsentative Ergebnisse der gewonnen Bildsätzen dar (Vergrößerung: 630x).

Nach Inkubation der Zellen mit SWCNT a.t. zeigte sich jedoch ein offenkundig anderes Bild. Zunächst konnte durch Anfärben des Aktin Cytoskeletts eine eindeutig erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden, die besonders an den CNT-Zell-Agglomeraten deutlich hervortrat (Abb. 4.26 (C)). Eine weitere Auffälligkeit zeigten diejenigen Zellen, die direkt mit *Carbon Nanotube* Bündeln Kontakt hatten, durch ein vermehrtes Ausbilden von Aktin Stressfasern, die an ihren Spitzen in Fokalen Adhäsionspunkten endeten. Dies wurde durch die Co-Lokalisation und Anhäufung des „Focal Adhesion“ Proteins Vinculin (grün) mit den Aktin Stressfasern (rot) in gelben Punkten im Overlay sichtbar (Abb. 4.26 (G)). Ein virtueller Querschnitt durch ein CNT-Zell-Agglomerat ist in Abb. 4.26 (H, I) dargestellt. Hier kann man deutlich erkennen, dass sich die Zellen nach einem Kontakt mit *Carbon Nanotube* Bündeln scheinbar aus dem Monolayer herauslösen (grüne Pfeile), um sich an die Nanotubes anzuheften. In Abb. 4.26 (I) sieht man Aktin Filamente von Zellen (weiße Dreiecke), die an ein Nanotube Bündel (blauer Pfeil) angrenzen und dieses umschließen. Dies scheint ein aktiver Prozess zu sein, da es zu einer starken Kondensation des Aktin Cytoskeletts und Ausbildung von Stressfasern kommt, die, wie im Overlay (G) erkennbar, in „Focal Adhesions“ enden.





**Abb. 4.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Carbon Nanotube* behandelten Zellen (A549)**

Für die Untersuchung der CNT-Zell-Agglomerate wurde das Aktin Cytoskelett und das „*Focal Adhesion*“ Protein Vinculin in fixierten A549 Fluoreszenz-markiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von A549 Zellen, die 24h mit  $23,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert waren. (B) Rhodamine Phalloidin Färbung des Aktin Cytoskeletts (C) Overlay (Vergrößerung 200x) (D) Lichtmikroskopische Aufnahme von A549 Zellen, die 24h mit  $23,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert waren. (E) Rhodamine Phalloidin Färbung des Aktin Cytoskeletts (F) Vinculin Alexa-488 nm Immunfärbung (G) Overlay (H, I) virtueller Querschnitt eines z-step ( $0,3 \mu\text{m}$ ) nach einer 3D-Bildbearbeitung mithilfe der Improvisation Volocity 4 Software. Die Zellen scheinen nach Kontakt mit CNTs aus dem Monolayer herauszuwachsen (grüne Pfeile) und durch Kondensation von Aktinfilamenten (weiße Dreiecke) ein CNT-Bündel (blauer Pfeil) zu umschließen. Die dargestellten Bilder stellen repräsentative Ergebnisse der gewonnenen Bildsätze dar (Vergrößerung: 630x).

#### **4.8.1 Aktivierung der „Focal Adhesion“ Signalkaskade durch Kohlenstoff Nanoröhren**

Das Substrat, insbesondere die Oberfläche und ihre chemische Zusammensetzung, reguliert und bestimmt das Verhalten von Zellen. Diese Regulation erfolgt über Integrin-vermittelte Signalwege und die Bildung von „Focal Adhesions“ (Curtis and Wilkinson, 1998; Yamada and Miyamoto, 1995). Es ist bekannt, dass bestimmte Proteine der „Focal Adhesion“ Komplexe, z.B. FAK und Vinculin eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und Zellmorphologie spielen (Dalby et al., 2000; Okumura et al., 2001). Des Weiteren konnten bisherige Studien zeigen, dass die EZM-abhängige Umgestaltung der Zellmorphologie sowie dreidimensionale Substrate die Signalwege von Integrinrezeptoren beeinflussen und somit zelluläre Funktionen verändern (Yamada and Miyamoto, 1995).

Eine der wichtigsten Kinasen in der Bildung und Regulation von „Focal Adhesion“ Kontakten wird durch die „Focal Adhesion Kinase“ (FAK) repräsentiert. FAK ist eine cytoplasmatische 125-kDa große Tyrosin Kinase und ein wichtiger Regulator der „Focal Adhesion“-Aktivierung und Komplexbildung mit Proteinen des Aktin Cytoskeletts, z.B. Vinculin (Schaller et al., 1992), und wird hierbei durch ihren Phosphorylierungsstatus aktiviert.

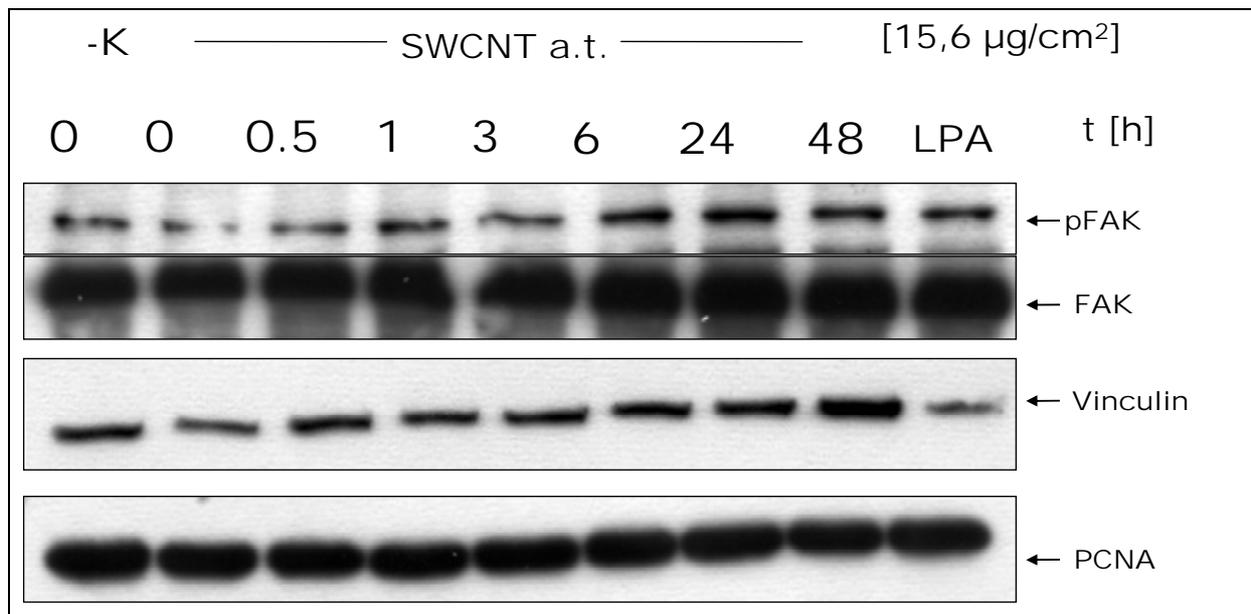
Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Experimenten zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens und strukturellen Veränderungen von humanen Lungenepithelzellen nach SWCNT a.t. Kontakt das Expressions- und Aktivitätsverhalten von FAK und Vinculin näher untersucht.

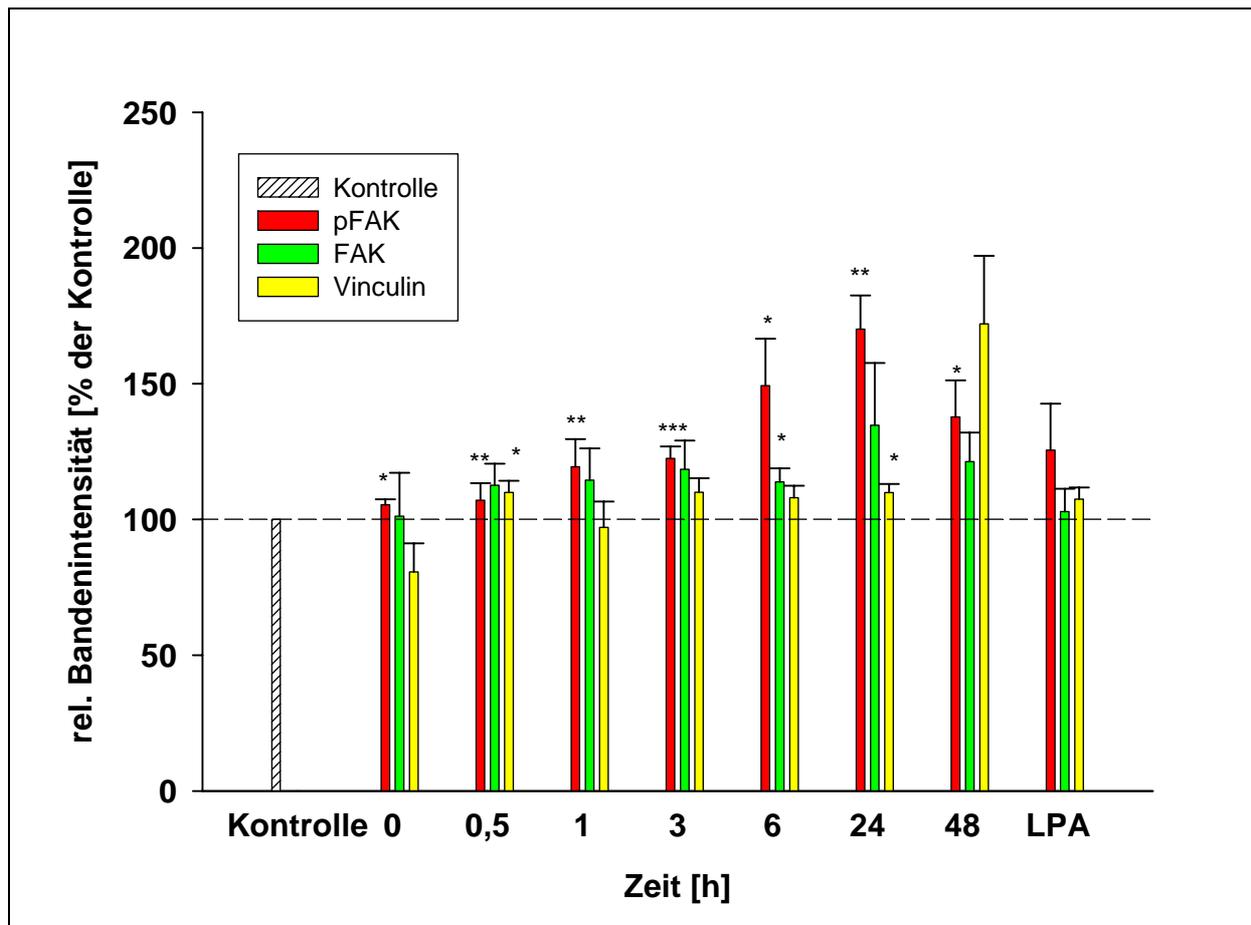
Zur Überprüfung der durch die Fluoreszenzauswertung erhaltenen Hinweise auf eine aktive Veränderung des Aktin Cytoskeletts mit Ausbildung von Stressfasern und „Focal Adhesions“ durch Kontakt der Zellen mit *Carbon Nanotubes*, sollte nun die Signalkaskade der „Focal Adhesion“ Formation auf Proteinebene mithilfe des Western Blots untersucht werden. Zur Erfassung der zeitlichen Aktivierung dieses Signalweges wurde die phosphorylierte Form von FAK (pFAK) im Vergleich zur unphosphorylierten Form (FAK) sowie die Expression von Vinculin in einem Zeitraum von 30 Minuten bis 48 Stunden CNT-Inkubation nachgewiesen.

A549 Zellen wurden hierfür mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) SWCNT a.t. für 30 Minuten, 1h, 3h, 6h, 24h und 48h behandelt, anschließend gründlich gewaschen, um Reste der Partikel zu entfernen und durch vorsichtiges Abschaben geerntet. Weiterhin konnten aus den jeweiligen Ansätzen Ganzzellproteinextrakte gewonnen und die Proben mithilfe des

Western Blots analysiert werden. Zellen mit einer 30-minütigen Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Lysophosphatidsäure (LPA), einem Lysophospholipid, wurden in diesem Versuch als Positivkontrolle verwendet (Kumagai et al., 1993). Die Bandenintensität wurde zusätzlich mithilfe der Software Odyssey 2.0 quantitativ ausgewertet und die Ergebnisse als relative Bandenintensität in Prozent der unbehandelten Kontrolle, welche auf 100% gesetzt wurde, errechnet und dargestellt.

Die Ergebnisse des in Abb. 4.27 dargestellten Western Blots demonstrieren tatsächlich eine messbare und signifikante Aktivierung von FAK im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Exposition der A549 Zellen mit SWCNT a.t. führte nach 6 Stunden zu einer leichten und nach 24 Stunden Inkubation zu einer offensichtlichen Erhöhung der gemessenen phosphorylierten, aktiven Form der „*Focal Adhesion*“ Kinase. Vinculin, ebenfalls ein „*Focal Adhesion*“ Protein, zeigte jedoch nach 48 Stunden Inkubation eine deutliche Erhöhung in seiner Proteinkonzentration, was wiederum für eine Aktivierung der „*Focal Adhesion*“ Signalkette durch die Behandlung mit SWCNT a.t. spricht.





**Abb. 4.27: Aktivierung der „Focal Adhesion“ Signalkaskade durch Carbon Nanotubes**

A549 Zellen wurden mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) SWCNT a.t. in einem Zeitraum von 30 Minuten, 1h, 3h, 6h und 24h behandelt und anschließend mithilfe des Western Blots auf die Aktivierung von FAK und die Expression von Vinculin untersucht. Die dargestellten Blots zeigen repräsentative Ergebnisse aus 5 unabhängigen Versuchen. Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte mithilfe der Software Odyssey 2.0 und die Ergebnisse der relativen FAK Aktivierung und Vinculin Expression wurden als Prozent der unbehandelten Kontrolle (100%) graphisch dargestellt. Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM [\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle].

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.8 legen nahe, dass eine leichte Erhöhung im Phosphoryierungsgrad der „Focal Adhesion“ Kinase pFAK und nachfolgend eine Neubildung des Adaptorproteins Vinculin nach CNT Inkubation stattfand. Gerade Vinculin ließ sich fluoreszenzmikroskopisch vermehrt in den „Focal Adhesions“ nachweisen, die am Ende von Stressfasern ausgebildet werden (Abb. 4.28).

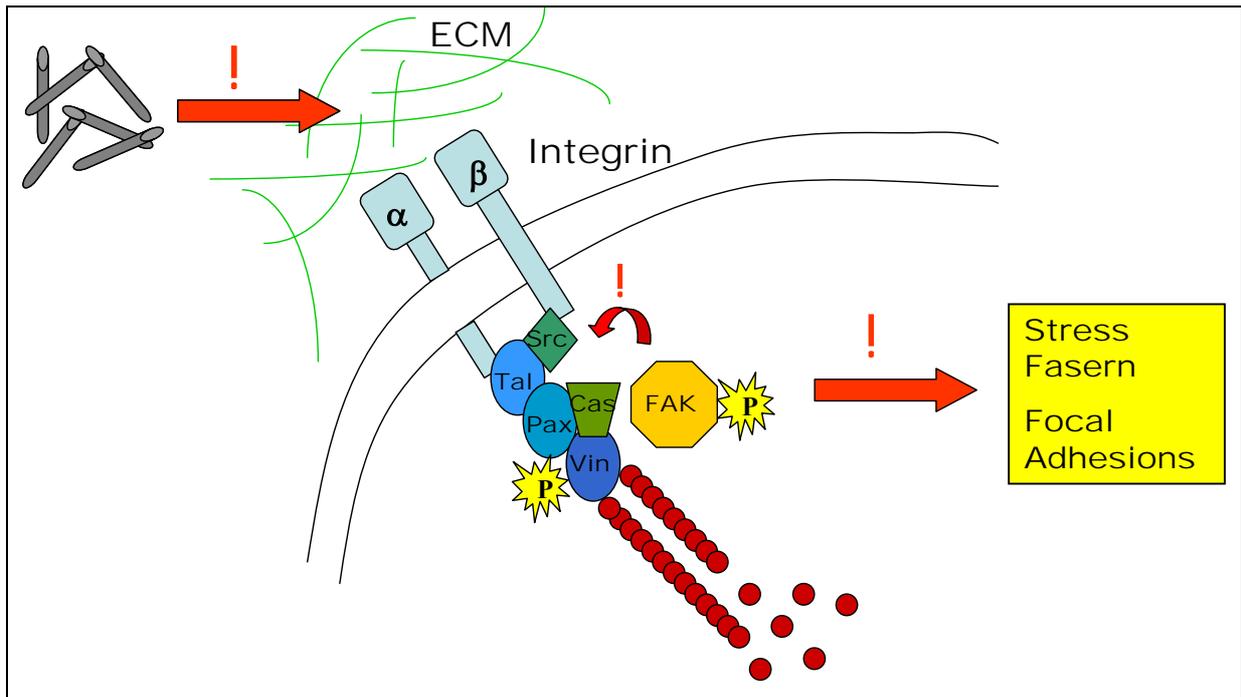


Abb. 4.28: Zusammenfassend schematische Darstellung der Aktivierung des „Focal Adhesion“ Signalweges nach *Carbon Nanotube* Inkubation

## 5 Diskussion

Epidemiologische Studien konnten einen klaren Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Exposition gegenüber feinen und ultrafeinen Partikeln und dem Anstieg der Erkrankungshäufigkeit und der Mortalität zeigen (Dockery et al., 2005; Pope, III et al., 2002). Gleichzeitig macht heutzutage der stetige Zuwachs von neuen Anwendungen synthetischer Partikel im Nanometerbereich eine erhöhte Exposition bzw. Inhalation immer wahrscheinlicher und damit potentiell gefährlicher.

Insbesondere für Kohlenstoff Nanoröhren, die eine völlig neuartige Form von Kohlenstoff Nanopartikeln darstellen, eröffnen sich ständig neue Anwendungsgebiete in der Elektro-, Biologischen- und Pharmazeutischen-Industrie, u.a. für Transistoren (Graham et al., 2005) und Flachbildschirme (Gröning et al., 2002; Rinzler et al., 1995), mikroskopische Analysen (Cheung et al., 2000; Kim and Lieber, 1999; Wong et al., 1998), Krebstherapie (Kam et al., 2005), Diagnostik sowie biologische und medizinische Forschung (Bianco et al., 2005; Chen et al., 2003; Kalra et al., 2003; Kam and Dai, 2005; Kong et al., 2000; Lovat et al., 2005; MacDonald et al., 2005; Pantarotto et al., 2004; Son et al., 2007; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2007) und schließlich wurden sogar Weltraumanwendungen postuliert (<http://www.nasa.gov/>). Bayer MaterialScience betreibt eine Pilot-Anlage zur Produktion von Baytubes® (MWCNTs) mit einer Jahreskapazität von 30 Tonnen. Geplant ist eine großtechnische Anlage mit einer Jahreskapazität von 3.000 Tonnen (<http://www.baytubes.com/>). Aufgrund dieser Massenproduktion und Verarbeitung von Nanoteilchen steigen die Möglichkeiten einer absichtlichen oder unabsichtlichen Exposition während der Produktion, Verarbeitung, Anwendung oder Entsorgung und damit auch das Gefahrenpotential dieser kleinsten Teilchen.

Es bleibt die Frage, ob die möglichen Gefahren der Nanotechnologie auf Gesundheit und Umwelt die vielen Vorteile überschatten (Krug and Diabaté, 2003). Materialien im Nanometerbereich, die ganz neue Eigenschaften aufweisen im Vergleich zu Materialien im Mikrometermaßstab, können toxikologische Effekte auf zellulärer Ebene sowie verändertes Expositions-, Biodistributions- und Exkretionsverhalten als auch außergewöhnliches Verhalten in der Umwelt aufweisen, die es in dieser Form bisher bei Partikeln noch nicht gab.

Es sind gerade diese neuartigen Eigenschaften, die Nanopartikel so interessant machen, aber gleichzeitig auch zu einer wesentlich höheren Reaktivität im Vergleich zu Partikeln

im Mikrometerbereich führen, denn das Verhältnis der Oberfläche zur Partikelgröße erhöht sich exponentiell mit dem Verringern des Durchmessers eines Partikels. Das Gefahrenpotential der Nanopartikel liegt deshalb vor allem in der kleinen Größe dieser Partikel und der gleichzeitig großen Oberfläche, die bei der Auslösung von Entzündungen eine wichtige Rolle spielen kann (Brown et al., 2004). In der Literatur ist zudem ausführlich die Gefährlichkeit von Schwebstaub, kleiner als 10 Mikrometer, als eindeutig lungengängig (PM<sub>10</sub>) und Partikel, kleiner als 2,5 Mikrometer (PM<sub>2,5</sub>), als alveolargängig beschrieben (Diabaté et al., 2002; Fujii et al., 2002; Li et al., 2003; Seaton et al., 1995). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) berichtete von Zusammenhängen zwischen einer Erhöhung der PM<sub>2,5</sub>-Konzentration und einem Anstieg der Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung. Die aktuellen Jahresmittelwerte der PM<sub>10</sub>-Konzentrationen betragen in Baden-Württemberg ungefähr 24 µg/m<sup>3</sup> (Landesanstalt für Umweltschutz BW (LUBW), Juli 2006). Laut WHO erhöht sich das Risiko der Mortalität bei einem PM<sub>10</sub> Anstieg von 10 µg/m<sup>3</sup> um 1,4%, während das von Lungenkrankheiten sogar um 4% steigt (WHO, 1999). Epidemiologische Studien des letzten Jahrhunderts konnten zeigen, dass Stäube am Arbeitsplatz, z.B. in Kohlebergwerken Lungenkrankheiten, wie chronische Bronchitis und Lungenemphyseme, besonders in Individuen mit bestehenden chronischen Lungenkrankheiten (Schwartz et al., 2001), hervorrufen (Jorna et al., 1994). Für faserartige Strukturen, wie z.B. Asbest ist außerdem hinreichend die Cytotoxizität, Kanzerogenität und Pathogenität beschrieben (Mossman and Churg, 1998; Yegles et al., 1995).

Die verschiedenartigen potentiellen Expositionswege der Partikel über die Atmung, Nahrung, Haut sowie die direkte Injektion von Nanopartikeln im medizinischen Bereich könnten zu adversen gesundheitlichen Effekten führen und erschweren ein Erfassen des toxikologischen Potentials. Untersuchungen von Maynard et al. (2004) konnten zum Beispiel zeigen, dass es während der Herstellung und Verarbeitung von Nanomaterialien zu Aerosol-Bildung und Exposition von *Carbon Nanotubes* am Arbeitsplatz kommen kann.

Ist erst einmal der Übergang der Partikel in die Blutbahn erfolgt, ist eine Verteilung und Ablagerung in so gut wie allen Organen möglich. Ein Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke könnte für bestimmte Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe möglich sein. Studien von Kreuter et al. (2002) sowie Gumbleton et al. (2003) beweisen, dass Mechanismen existieren, die einen Übergang von Nanopartikeln von der Lunge ins Blut nahe legen und dass diese

Partikel auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Oberdörster, 2004). Kreyling et al. (2002) konnten in diesem Zusammenhang allerdings zeigen, dass die systemische Verteilung von Partikeln im Organismus im Allgemeinen sehr gering ausfällt.

Das toxikologische Profil von Nanopartikeln ist erst im letzten Jahrzehnt etwas deutlicher hervorgetreten. Eine Schlüsselstudie konnte zeigen, dass nano-skalisches TiO<sub>2</sub> (20 nm) in Inhalationsstudien mit Ratten zu einer höheren pulmonären inflammatorischen Antwort im Vergleich zu größeren TiO<sub>2</sub> (250 nm) Partikeln bei gleicher Massenkonzentration führte (Baggs et al., 2001; Oberdörster et al., 2000). Weitere Studien mit Polystyrol Partikeln (Brown et al., 2001), Carbon Black (Renwick et al., 2004; Stone et al., 2000), C<sub>60</sub> Fullerenen (Adelmann et al., 1994) und Kupfer Nanopartikeln (Chen et al., 2006), konnten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der vergrößerten Oberfläche und erhöhter Reaktivität und Toxizität von Nanopartikeln herstellen.

Über eine mögliche Toxizität von *Carbon Nanotubes* und patho-physiologische Wirkungsmechanismen dieser Partikel ist bisher allerdings wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Sorten von einwandigen Kohlenstoff Nanoröhren auf ihre akute Cytotoxizität und die partikel-induzierten Mechanismen zellphysiologischer Veränderungen im *in vitro* System überprüft. Als Zellmodell wurde eine Lungenepithel- (A549) und Endothel-ähnliche Zelllinie (ECV304) ausgewählt, da die Partikel-Inhalation einer der bedeutendsten Expositionswege darstellt. Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien ermöglichten Einblicke in die Veränderungen von Lungenzellen nach Kontakt mit *Carbon Nanotubes*, welche auch *in vivo* zu erwarten sind. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden jeweils Parallelansätze mit einem gut charakterisierten Referenzpartikel, dem elementaren Kohlenstoff (CB14), durchgeführt (Koike and Kobayashi, 2006; Lambert et al., 2003). Die Größe der Primär-Partikel des elementaren Kohlenstoffs (CB14) liegt bei 14 nm, die allerdings zu Aggregaten zusammengelagert sind, ähnlich den Aggregaten der CNTs, welche durch die TEM-Aufnahmen gut sichtbar waren (Abb. 4.2). Für *Carbon Black* ist bekannt, dass die Inhalation dieser Feinstpartikel zu verstärkten Entzündungsmechanismen in der Lunge und sogar zu Tumorwachstum führen kann (Lambert et al., 2003).

Die einzigartigen Eigenschaften von Kohlenstoff Nanoröhren könnten zu außergewöhnlichen gesundheitlichen Risiken führen (Borm, 2002; Donaldson et al.,

2006). Aus diesem Grund ist eine Evaluation der möglichen Risiken und ein Verständnis des Verhaltens dieser neuen Nanomaterialien im Organismus und der Umwelt unabdingbar.

### **5.1 Charakterisierung von Kohlenstoff Nanoröhren in biologischen Systemen**

Zusätzlich zur chemischen Untersuchung (siehe Material und Methoden) wurde das Verhalten der *Carbon Nanotubes* in wässriger Lösung ( $H_2O$  bidest.) nach Ultraschallbehandlung der CNT-Stammlösung beobachtet und beschrieben (Abb. 4.1) und die einzelnen Materialien weiterhin im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) genauer charakterisiert (Abb. 4.2).

Aufgrund ihrer sehr geringen Wasserlöslichkeit und der hohen van-der-Waals Anziehungskräfte formen *Carbon Nanotubes* gewöhnlich große Bündel von Aggregaten, die nur schwer zu vereinzeln sind und sich in Abhängigkeit vom CNT-Material bilden (Wick et al., 2007). Ein unterschiedliches Agglomerations- und Aggregationsverhalten in wässriger Lösung konnte ebenfalls mit den hier verwendeten CNT-Materialien festgestellt werden und wurde auch von anderen Gruppen beobachtet und bestätigt (Chen et al., 2004; Wick et al., 2007). Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten von *Carbon Nanotubes* sind in der Synthese und anschließenden Modifizierungen der Kohlenstoff Nanoröhren zu suchen, wobei die Oberfläche hier eine bedeutende Rolle spielen könnte.

Das unkontrollierte Aggregieren von CNTs sowie anderer Nanopartikel, wie z.B. Nano-TiO<sub>2</sub> in physiologischen Lösungen und im Zellkulturmedium (Long et al., 2007) stellt ein großes Problem der Risikoanalyse dar und kann derzeit nur durch zusätzliche Veränderungen der Partikel beeinflusst werden (Isobe et al., 2006). Hierzu gehört zum Beispiel das Verwenden von Säure zur Aufreinigung bzw. Funktionalisierung von CNTs, welches zu einer erhöhten und stabileren Löslichkeit in wässrigen Lösungen im Vergleich zum unmodifizierten Rohmaterial führt (Kam and Dai, 2005; MacDonald et al., 2005). Kovalent-modifizierte und funktionalisierte SWCNT zeigen eine verbesserte Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln und die chemische Derivatisierung mit hydrophilen Substituenten, Hydroxyl- oder Carboxylgruppen, bietet die Möglichkeit zur weiteren Funktionalisierung mit biologisch aktiven Molekülen (Pantarotto et al., 2003; Peng et al.,

2003). Die Verwendung von Amylose (Stärke) (Star et al., 2002) oder auch Polymeren führt zur Umhüllung der CNTs und somit ebenfalls zur verbesserten Löslichkeit von Kohlenstoff Nanoröhren. Auch die Verwendung von Surfactants bietet die Möglichkeit, CNTs in wässriger Lösung zu vereinzeln (Strano et al., 2003; Wick et al., 2007).

Stabilität und Dispergierverhalten der Nanopartikel muss in Kompatibilität mit *in vitro* und *in vivo* Systemen stehen. Die Hauptbestandteile der Lungenflüssigkeit, z.B. Proteine und Phospholipide, erscheinen hierfür besonders geeignet (Kendall et al., 2004). Faucaud et al. (2007) untersuchten die Auswirkungen von DPPC („*dipalmitoyl phosphatidyl choline*“), einem Bestandteil des Lungen-Surfactant, sowie BSA, auf das Dispergierverhalten von *Carbon Black* (CB14) und konnten zeigen, dass die Stabilitätsdauer der Partikelsuspension mithilfe der Zusätze, im Vergleich zum reinen Zellkulturmedium, ungefähr um das Doppelte erhöht wurde. Der stabilisierende Effekt könnte aufgrund der Adsorption dieser Proteine und Phospholipide an die Partikeloberfläche erreicht werden (Brown et al., 2000).

Die unspezifische Adsorption von Proteinen und Molekülen an der Oberfläche ist ebenfalls für CNTs beschrieben und muss bei der Verwendung von Serumproteinen im Zellkulturmedium im *in vitro* System ebenfalls berücksichtigt und bei der Charakterisierung von Kohlenstoff Nanoröhren in biologischen Systemen einkalkuliert werden (Collins and Avouris, 2000; Kong et al., 2000; Shim et al., 2002). Casey et al. (2007) konnten z.B. zeigen, dass Serum im Medium zu einem erhöhten Dispergierverhalten der CNTs führt.

In dieser Arbeit wurde auf die Zugabe von chemischen Zusätzen (z.B. DMSO, DMF) oder Surfactants (Tween 80, SDS) verzichtet, um störende Einflüsse in den Zellkulturversuchen zu vermeiden, aber auch, um das normal auftretende Aggregationsverhalten der *Carbon Nanotubes* und die daraus resultierende Toxizität zu untersuchen. Allerdings wurde dem Zellkulturmedium FCS zugesetzt, so dass eine, wie oben beschriebene unspezifische Adsorption der Serumproteine an die CNTs stattgefunden haben könnte.

Das Funktionalisieren der CNT-Oberfläche oder mechanische Dispergierverfahren durch z.B. Ultraschallbehandlung, kann Nanotubes teilweise beschädigen und zu einer Ansammlung von CNT-Bruchstücken führen. Auch wenn fraktale Aggregate ebenso die für Nanopartikel typisch große Oberfläche und weitere Charakteristika von individuellen Nanopartikeln besitzen (Phenrat et al., 2007), müssen die Vor- und Nachteile einer Veränderung des Rohmaterials gründlich überlegt und abgewogen werden.

Mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) können einzelne *Carbon Nanotubes* und die Bildung von komplexen Netzwerken von ineinander verschlungenen CNTs gut charakterisiert werden (Murr, 2005; Shvedova et al., 2005). Die in Abbildung 4.2 dargestellten TEM-Aufnahmen zeigen die röhrenartige Form und Größe sowie die Verunreinigungen bzw. Funktionalisierung der verwendeten CNT-Materialien. Auch eine eindeutige Zusammenlagerung der einzelnen Nanotubes zu großen Aggregaten und Agglomeraten wurde hier ebenfalls sichtbar.

Mithilfe der TEM-Analyse konnten somit insbesondere die in wässriger Lösung beobachteten Unterschiede der unbehandelten NT-1 sowie der Säure-behandelten CNTs hinsichtlich ihrer Verunreinigung und der Tendenz zu aggregieren, hervorgehoben und genauer charakterisiert werden.

## **5.2 Aufnahme von Kohlenstoff Nanoröhren in Lungenzellen**

Zusätzlich zu der Exposition von natürlichen und anthropogenen Partikeln kann es im Zeitalter der Nanotechnologie ständig zu einem unabsichtlichen oder gezielten Kontakt mit Nanomaterialien und deren Aufnahme in den Organismus kommen. Die Lunge ist dabei ein sehr wichtiges Zielorgan, da die potentielle Exposition während der Produktion und anschließenden Verarbeitung hauptsächlich über die Atmung geschieht.

Erste Messungen einer arbeitsplatzbezogenen Exposition mit CNTs ergab eine relativ geringe Menge von ungefähr  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , welche hauptsächlich in Form von Aggregaten gefunden wurde (Maynard et al., 2004). Dennoch können auch sehr geringe Konzentrationen von Nanomaterialien eine große Partikelanzahl enthalten, welches aus Studien mit Ultrafeinpartikeln bekannt ist (Hughes et al., 1998). Für verschiedene Nanopartikel ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , Co) ist beschrieben, dass sie in Endothelzellen (Peters et al., 2004), Leberzellen (Hussain et al., 2005) und Nervenzellen (Long et al., 2006) aufgenommen werden können und zum größten Teil in Zelleinschlüssen vorzufinden sind.

Dass es nach Exposition der Lunge mit *Carbon Nanotubes* tatsächlich zu pulmonalen Effekten und einer Interaktion des Lungengewebes mit SWCNTs kommt, berichten zwei

unabhängige Studien nach intratrachealer Instillation von sowohl Mäusen (Lam et al., 2004) als auch Ratten (Warheit et al., 2004). Beide Gruppen beschreiben die Bildung von Granulomata und interstitiellen Entzündungen. Warheit et al. folgern aus diesen Ergebnissen, dass diese Beobachtungen keine physiologische Relevanz haben und aufgrund der starken Agglomeration der Nanotubes hervorgerufen wurden. Die Gruppe von Lam et al. zeigt allerdings, dass der Kontakt von CNTs mit der Lunge toxischer als die Exposition mit *Carbon Black* sowie Quarz sein könnte. Entzündungsmechanismen mit der Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in der Lunge von Mäusen und Ratten nach CNT Exposition wurde ebenfalls beschrieben (Muller et al., 2005; Shvedova et al., 2005).

Aufgrund der vorhandenen Hinweise aus der Literatur kann es nach Inhalation von Nanopartikeln tatsächlich zu einem direkten Kontakt mit dem Lungenepithel kommen. Deshalb wurden zur Untersuchung der CNT-Aufnahme humane Lungenepithelzellen (A549) und Endothel-ähnliche Zellen (ECV304) verwendet. Die Partikelinteraktion in submerser Kultur mit menschlichen Zellen als auch die Partikelaufnahme konnten sowohl im Lichtmikroskop als auch im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) dokumentiert werden.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.3) demonstrieren, dass Nanotubes sehr gut und eindeutig zu identifizieren waren und tatsächlich mit dem Zellrasen in Kontakt kamen. Auffällig war dabei die Bildung großer CNT-Aggregate, die trotz Ultraschallbehandlung nicht vollständig vereinzelt, als schwarze Bündel gut sichtbar waren und sich von dem Zellrasen abhoben. Diese Beobachtungen konnten sowohl für SWCNTs (Davoren et al., 2007) als auch MWCNTs (Pensabene et al., 2007) beschrieben werden, wobei ebenfalls davon berichtet wird, dass sich diese CNT-Bündel nur schwer von der Zelloberfläche ablösen lassen.

Für ultrafeine Partikel konnte gezeigt werden, dass sie vereinzelt schon nach einer Stunde und in großen Mengen nach 24h Inkubation in A549 Zellen vorzufinden waren (Stearns et al., 2000). Dabei konnten Stearns et al. mithilfe von TEM-Aufnahmen beobachten, dass die Partikel als Aggregate hauptsächlich in membrangebundenen Zelleinschlüssen im Cytoplasma vorlagen und es zu einer Erhöhung der Zahl von Lamellar-Körperchen kam. Aber auch nicht-endocytische Mechanismen, z.B. Adhäsionskräfte können bei der Partikelaufnahme eine Rolle spielen, da Ultrafeinstäube auch frei im Cytoplasma vorzufinden waren (Geiser et al., 2005).

TEM-Bilder ermöglichen somit die Aussage, ob *Carbon Nanotubes* im submersen *in vitro* Kultursystem lediglich an der Zelloberfläche haften oder aber auch die Zellmembrangrenze überwinden können und im Cytosol vorzufinden sind. Das lässt sich mit lichtmikroskopischen Aufnahmen nicht mit Sicherheit nachweisen.

Kohlenstoff Nanoröhren sind aufgrund ihrer Größe und ihrem geringen Kontrastverhältnis gegenüber dem Hintergrund der Zellen im TEM nur sehr schwer zu erkennen. Dennoch zeigen die TEM-Bilder (Abb. 4.4), dass CNTs nach 24h intrazellulär als große Aggregate und Bündel zu sehen waren und gut identifiziert werden konnten. In den geringen Vergrößerungsstufen waren sie als große Agglomerate, bestehend aus vielen knäuelartig liegenden Nanotubes sichtbar. Erst bei höherer Vergrößerung konnten zum Teil auch vereinzelte, eng aneinander liegende Röhren charakterisiert werden. Einzelne Nanotubes konnten jedoch aufgrund der begrenzten Auflösung nicht sichtbar gemacht werden. Diese Aufnahmen machen wiederum deutlich, dass sich die Kohlenstoff Nanoröhren trotz Ultraschallbehandlung nur schwer vereinzeln lassen. Andererseits konnte mithilfe der TEM-Aufnahmen gezeigt werden, dass die verwendeten Zellen die Partikel aufgenommen hatten und die CNTs sowohl frei im Cytoplasma als auch in endolysosomalen Zelleinschlüssen vorzufinden waren. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zeigten die CNT-behandelten Zellen jedoch keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Lediglich die Anzahl der Zellfortsätze und Lamellar-Körperchen (A549) war bei CNT-inkubierten Zellen leicht erhöht und stimmte mit den Literaturhinweisen überein (Stearns et al., 2000). Damit können die beobachteten Testergebnisse mit der Aufnahme der Nanotubes in die Zelle in Verbindung gebracht werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für Alveolarmakrophagen der Ratte nach NT-1-Inkubation beschrieben werden (Pulskamp et al., 2007).

Die Inhalation mag der hauptsächliche Expositionsweg für Nanopartikel sein, aber dennoch muss die Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt sowie über die Haut während der Produktion, Verarbeitung und Entsorgung von Nanopartikeln untersucht werden. Insbesondere bei neuen biomedizinischen Anwendungen in Diagnostik und Therapie wird es auch zu einer direkten Exposition mit dem Gefäßsystem und dem Gewebe kommen, was ebenfalls berücksichtigt werden muss.

Die Expositionsanalysen von Maynard et al. (2004) unterstützen die Hypothese, dass aufgrund ihrer Tendenz zur Agglomeration die Exposition von inhalierbaren Nanotubes sehr gering ausfällt. Der Kontakt mit der Haut während der Verarbeitung und Produktion kann

jedoch wesentlich höher ausfallen. So wurden in der künstlich hervorgerufenen Situation von Maynard et al. (2004) Depositionen von bis zu 6 mg pro Hand gemessen.

TEM-Aufnahmen konnten zeigen, dass unmodifizierte MWCNTs in humane Keratinocyten aufgenommen werden (Monteiro-Riviere et al., 2005). Sie wurden entweder frei im Cytoplasma oder in Zelleinschlüssen, aber nicht im Kern gefunden. Einige lagerten sich auch an die äußere Zellmembran an. Nach 18h Inkubation mit SWCNTs zeigten humane Keratinocyten eine veränderte Zellmorphologie mit Zellseparation vom Monolayer, strukturellen Veränderungen von Mitochondrien, Kern und anderen cytoplasmatischen Organellen und eine veränderte Oberflächenhomogenität des Zellverbandes (Shvedova et al., 2003). Die Aufnahme von funktionalisierten fSWCNTs in Keratinocyten erfolgte in intrazellulären Einschlüssen (Zhang et al., 2007).

Die vorliegenden Ergebnisse sowie Hinweise aus der Literatur belegen eindeutig, dass Nanomaterialien von verschiedenen Zelltypen aufgenommen werden können, wobei die genauen Aufnahmemechanismen bis zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend ungeklärt sind (Long et al., 2007). Die Möglichkeit der Phagozytose und der Endozytose wird für die Aufnahme von TiO<sub>2</sub> spekuliert (Rothen-Rutishauser et al., 2006) und insbesondere mit der Partikeloberfläche, Morphologie sowie dem Aggregationsverhalten in Verbindung gebracht (Limbach et al., 2005; Wiesner et al., 2006).

Die bisherigen CNT-Daten beweisen, dass die Aufnahme unabhängig vom jeweiligen Zelltyp oder CNT-Material ist. Die Gruppen Pantarotto et al. (2004) sowie Bianco et al. (2005) konnten beispielsweise fluoreszenzmikroskopisch zeigen, dass mit Aminogruppen-funktionalisierte und FITC-markierte SWCNTs von Fibroblasten aufgenommen werden und sowohl im Cytoplasma als auch im Kern gefunden wurden. Beide Gruppen vermuten eine passive Partikelaufnahme und schließen die Endozytose aufgrund von Inhibitionsversuchen und fehlender Temperaturabhängigkeit aus.

Andererseits gibt es ebenfalls Hinweise auf einen aktiven Energie-abhängigen Aufnahmemechanismus von *Carbon Nanotubes* (Kam et al., 2005; 2006).

Effektive Transportmechanismen zur gezielten Verabreichung von Peptiden, Proteinen und Oligonucleotiden in spezifische Kompartimente von Zellen oder zum Durchqueren der Blut-Hirn-Schranke (Kreuter et al., 2002; Tosi et al., 2007) sind dringend notwendig.

Nanopartikel stellen hierbei ein viel versprechendes Transportmittel dar, um konstitutiv und Liganden-abhängig zelluläre Aufnahmemechanismen, z.B. „*clathrin-coated pits*“ und Caveolae, anzusteuern und zu aktivieren. So konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme

von Streptavidin-funktionalisierten SWCNTs in adhärenente und nicht-adhärenente Zellen über die Endocytose erfolgt und sich intrazellulär in Endolysosomen befinden (Kam and Dai, 2005). Aktive Aufnahmemechanismen von SWCNTs in murinen Makrophagen-ähnlichen Zellen wurden mittels „Near-Infrared“-Mikroskopie ermittelt. Im Vergleich zu den bei 37°C-inkubierten Proben fand bei 27°C nur noch eine 40%-ige CNT-Aufnahme statt (Cherukuri et al., 2004). Cherukuri et al. schätzen außerdem die Aufnahmerate auf ungefähr ein Nanotube pro Sekunde pro Zelle. Oberflächenrezeptoren, wie z.B. die Scavenger Rezeptoren, werden als mögliche Aufnahmemechanismen für Partikel ebenfalls diskutiert (Husemann et al., 2002; Kim et al., 1999; Kim et al., 2005; Palecanda et al., 1999). Schließlich wurde auch ein sowohl Energie-abhängiger als auch unabhängiger Aufnahmemechanismus für funktionalisierte Nanotubes in Abhängigkeit ihrer Größe beschrieben (Kostarelos et al., 2007).

Ein weiterer Expositionsweg, der vor allem in der zukünftigen biomedizinischen Behandlung eine wichtige Rolle spielen könnte, ist die intravenöse Verabreichung der Nanopartikel, welche somit direkt in die Blutbahn übergehen und ungehindert zu Zellen, Gewebe und Organe transportiert und aufgenommen werden können. Bisherige Studien konnten zeigen, dass die intravenöse Applikation von SWCNTs zu einem schnellen Coating der CNTs mit Serumproteinen führte und die Partikel eine Halbwertszeit von ungefähr einer Stunde im Blut haben. Signifikante CNT-Konzentrationen konnten dabei nur in der Leber gefunden werden (Cherukuri et al., 2006). Radioaktiv-markierte, wasserlösliche fSWCNTs und fMWCNTs zeigten nach intravenöser Gabe bei Mäusen ebenfalls ein schnelles Exkretionsverhalten mit einer Halbwertszeit im Blut von 3,5 Stunden (Singh et al., 2006). Wang et al. (2004) konnten zum ersten Mal das Distributionsverhalten von I<sup>125</sup>-markierten SWCNTs *in vivo* in Mäusen beschreiben. Dabei zeigte sich, dass sich CNTs nach Injektion frei in allen Kompartimenten, mit Ausnahme des Gehirns, verteilten. Eine deutliche Akkumulation fand man dabei in den Nieren und Knochen. Nach 11 Tagen waren 80% des CNT-Materials wieder ausgeschieden. Mithilfe der „Near-Infrared“-Methode können CNTs neuerdings auch im lebenden Organismus nachgewiesen und deren Verteilung verfolgt werden. In Drosophila Larven konnte so gezeigt werden, dass die Mehrheit der über das Futter aufgenommenen SWCNTs den Verdauungstrakt durchlief und wieder ausgeschieden wurde. Nur ein sehr geringer Teil wurde in weiteren Organen gefunden (Leeuw et al., 2007).

Bevor toxikologische Daten interpretiert werden, ist es wie zuvor beschrieben notwendig, die zu erwartende Exposition von Nanopartikeln zu charakterisieren und zu definieren, um die entsprechenden toxikologischen Endpunkte im zellulären System, im Organ bzw. im gesamten Organismus zu untersuchen (Donaldson et al., 2006). Die vielen verschiedenen Expositionswege der CNTs unterscheiden sich deutlich von denen der anthropogenen Ultrafeinstäube, die hauptsächlich durch Inhalation aufgenommen werden können. Unabhängig vom Expositionsweg können jedoch, wie aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und Literaturhinweise gezeigt, *Carbon Nanotubes* in die verschiedensten Zelltypen durch sowohl Energie-abhängige als auch -unabhängige Transportmechanismen aufgenommen werden und sich im Organismus relativ frei bewegen. Dementsprechend unterschiedlich können die zu erwartenden zellulären Effekte und Reaktionen der Kohlenstoff Nanoröhren, ihre akute Toxizität und ihr Entzündungspotential, sein.

### **5.3 Akute Toxizität von Kohlenstoff Nanoröhren – toxisch oder nicht toxisch?!**

In Abbildung 4.4 konnte mithilfe von TEM-Bildern eindeutig gezeigt werden, dass die verwendeten Kohlenstoff Nanoröhren sowohl in A549 als auch in ECV304 Zellen internalisiert werden und zum größten Teil in cytoplasmatischen Zelleinschlüssen vorlagen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die CNT-Aufnahme unabhängig vom jeweiligen Material war, so dass auftretende zelluläre Veränderungen und Reaktionen mit der Partikelaufnahme in die Zelle in Verbindung gebracht werden können.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der Zellvitalität nach *Carbon Nanotube*-Exposition sind oft sehr widersprüchlich und lassen Raum für Spekulationen. Einige Gruppen berichten von einer erheblichen CNT-induzierten akuten Cytotoxizität (Bottini et al., 2006; Cui et al., 2005; Jia et al., 2005; Magrez et al., 2006; Manna et al., 2005; Sharma et al., 2007; Shvedova et al., 2003; Zhang et al., 2007), während andere Arbeitsgruppen wiederum von einem fehlenden akut-cytotoxischen Verhalten der CNTs berichten (Cherukuri et al., 2004; Davoren et al., 2007; Dumortier et al., 2006; Flahaut et al., 2006; Ghibelli et al., 2005; Isobe et al., 2006; Kam and Dai, 2005; MacDonald et al., 2005; Pantarotto et al., 2004; Pensabene et al., 2007).

Zu den kritischen Stimmen gehören die Arbeiten von Shvedova et al. (2003), die an menschlichen Keratinozyten zeigen konnten, dass nach Inkubation mit SWCNTs oxidativer Stress, Vitalitätsverlust sowie morphologische Veränderungen der Zellen induziert werden. Im Vergleich zu Asbestfasern, Quarz und C<sub>60</sub> Fullerenen wird sogar von einer entsprechenden oder sogar höheren CNT-induzierten Cytotoxizität gesprochen (Jia et al., 2005; Murr, 2005). Andererseits gibt es Berichte von einem fehlenden Vitalitätsverlust nach Inkubation mit funktionalisierten SWCNTs (MacDonald et al., 2005).

In Kenntnis dieser Arbeiten wurde für die vorliegende Studie eine vornehmlich cytotoxische Reaktion der *Carbon Nanotubes* auf A549 bzw. ECV304 Zellen erwartet. Die Bestimmung der Toxizität sollte zunächst mithilfe des MTT-Tests durchgeführt werden (Mosmann, 1983). Dieser Test wird allgemein als Vitalitätstest *in vitro* angewendet, indem die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen der Zellen gemessen wird. Bei diesem Test handelt es sich um eine kolorimetrische Analyse, der eine Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid, MTT) zu blauen unlöslichen Formazan-Kristallen durch die mitochondrialen Dehydrogenasen zugrunde liegt.

Die Inkubation von A549 Zellen führte schon nach 24h zu einem Vitalitätsverlust von ~ 60% wobei dieser Effekt nach längerer Inkubationszeit nicht weiter gesteigert wurde (Abb. 4.5 (A)). Die Ergebnisse der einzelnen *Carbon Nanotube* Materialien waren in ihrer Wirkung vergleichbar, auch wenn leichte Unterschiede, insbesondere der fSWCNTs, erkennbar waren. Die funktionalisierten *Carbon Nanotubes* (fSWCNT) zeigten hierbei den geringsten Effekt auf die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Die Wirkungen von CB14 und CNT-Partikeln waren miteinander vergleichbar.

Dieser sehr deutliche Verlust der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen nach 24 bis zu 96 Stunden CNT-Exposition, gemessen mit dem MTT-Test, wurde ebenfalls durch andere Arbeitsgruppen bei Verwendung verschiedener Zelllinien nachgewiesen und war konform mit den hier beschriebenen Resultaten (Cui et al., 2005; Jia et al., 2005; Magrez et al., 2006; Manna et al., 2005; Murr, 2005; Sharma et al., 2007; Würle-Knirsch et al., 2006; Zhang et al., 2007). Die Beobachtung des geringen Effektes der funktionalisierten fSWCNTs in diesem Testsystem wurde auch von Sayes et al. (2006) sowie Zhang et al. (2007) beschrieben, die zeigen konnten, dass mit zunehmender Funktionalisierung von

Nanotubes die Cytotoxizität, gemessen mit dem MTT-Test, abnimmt. Auch für funktionalisierte, wasserlösliche C<sub>60</sub> Fullerene wurde eine geringere Toxizität im Vergleich zum unmodifizierten Rohmaterial beschrieben (Sayes et al., 2004).

Um die Ergebnisse aus dem MTT-Test mit einem anderen Test zu verifizieren, wurde der LDH-Test durchgeführt. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein cytoplasmatisches Enzym, das im Überstand eines Zellsystems als Parameter zur Überprüfung der Membranintegrität und damit der Zellvitalität genutzt werden kann.

Überraschenderweise konnte hier im Gegensatz zum MTT-Test kein signifikanter Vitalitätsverlust festgestellt werden. Die Ergebnisse in Abbildung 4.5 (B) beweisen, dass eine Inkubation der A549 Zellen mit den verschiedenen CNTs weder nach 24 Stunden, noch nach Langzeitinkubation von bis zu 96 Stunden zu einem signifikanten Verlust der Zellmembranintegrität führte.

Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse aus den beiden Vitalitätstests wurde zusätzlich eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt, welches ein weiterer Parameter zur Überprüfung der Zellmembranintegrität ist. Mithilfe dieser Färbemethode konnte das Ergebnis des LDH-Tests tatsächlich bestätigt werden, da es nach Partikelinkubation weder durch die SWCNT a.p., noch durch die SWCNT a.t. in einem Zeitraum von bis zu 96 Stunden zu einem Verlust der Membranintegrität kam (Abb. 4.5 (C)).

Überraschenderweise konnten diese beiden weiteren Vitalitätstests, der LDH-Test und das Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (PI), die beide ein Maß für die Zellmembranintegrität sind, das Ergebnis des MTT-Tests nicht bestätigen.

In wieweit der MTT-Test vielleicht einen Effekt auf die Mitochondrien nachweist, ohne die Vitalität der Zellen zu beeinflussen, war bisher ungeklärt. Daher wurde auf einen weiteren Assay zurückgegriffen, der die Mitochondrien und die Dehydrogenasen testet, um einen direkten Vergleich zu haben. Mit dem WST-1 Test, der auf dem gleichen Prinzip wie dem des MTT-Tests beruht, wobei hier allerdings ein löslicher Formazan-Farbstoff entsteht, sollten die Ergebnisse überprüft werden.

Im Gegensatz zum MTT-Test zeigte jedoch überraschenderweise der WST-1 Test keinen signifikanten Verlust der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen nach CNT-Inkubation, sondern ließ wiederum eine fehlende Cytotoxizität nach CNT-Inkubation erkennen (Abb. 4.5 (D)).

Diese Experimente machten zusätzlich deutlich, dass die widersprüchlichen Ergebnisse aus den MTT und den WST-1 Testsystemen unabhängig von den verwendeten Zelllinien und Zelltypen sind. Sowohl humane Lungenepithel- und Endothel-ähnliche Zellen als auch Alveolarmakrophagen der Ratte zeigten vergleichbare Ergebnisse (Pulskamp et al., 2007; Wörle-Knirsch et al., 2006).

Auch andere Gruppen berichten über einen fehlenden Vitalitätsverlust nach Behandlung mit CNTs unter Verwendung unterschiedlicher Testsysteme: TrypanBlau (Bottini et al., 2006; Garibaldi et al., 2006), NeutralRot (Monteiro-Riviere et al., 2005), CellTiter96 MTS (Kam and Dai, 2005) und AlamarBlue (Nimmagadda et al., 2006).

### **5.3.1 Kohlenstoff Nanoröhren interagieren mit *in vitro* Testsystemen**

Für eine nähere Untersuchung der scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse aus dem MTT-Test, der einen starken cytotoxischen Einfluss der CNTs auf Lungenzellen zeigt, aber weder durch den LDH-Test, noch PI-Färbung oder dem WST-1-Test bestätigt werden konnte, wurden die *Carbon Nanotubes* aus den entsprechenden Testsystemen extrahiert und mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops charakterisiert (Abb. 4.6).

Die TEM-Aufnahmen von Nanotubes zeigen SWCNTs nach Inkubation mit verschiedenen Formazan-Farbstoffen. Im Vergleich zu SWCNTs, die mit dem Tetrazoliumsalz im WST-1-Test inkubiert waren, welcher zu einem wasserlöslichen Formazan-Farbstoff reduziert wird (B), belegen die morphologischen Veränderungen der CNTs aus dem MTT-Test, dass sich Nanotubes offenbar mit dem unlöslichen MTT-Formazan verbinden können und so den Test beeinflussen (C). Die TEM-Bilder der extrahierten Nanotubes zeigen, dass diese mit dem MTT-Formazan Farbstoff bedeckt sind, der die Partikel irreversibel miteinander verklebt und sich weder durch physikalische (Ultraschall) noch chemische (Isopropanol/HCl, SDS, Acetone) Einwirkungen ablösen lässt (Daten nicht gezeigt). Der Farbstoff wird so aus dem Testsystem entfernt und die quantitative Messung führt zu einem „falsch positiven“ Ergebnis in Bezug auf die cytotoxische Wirkung der Kohlenstoff Nanoröhren im *in vitro* System, gemessen mit dem MTT-Test (Wörle-Knirsch et al., 2006).

Die Oberfläche der CNTs und deren Veränderung durch Funktionalisierung scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Sayes et al. (2006) berichten u.a., dass funktionalisierte CNTs einen geringeren Vitalitätsverlust, gemessen mit dem MTT-Test, zeigen. Dies konnte ebenfalls mit den hier verwendeten fSWCNTs beobachtet werden, da diese im MTT-Test einen wesentlich geringeren „falsch positiven“ Effekt, im Vergleich zu den übrigen CNTs, aufweisen (Abb. 4.5 (A)). Dies könnte auf ihre veränderte Struktur und verbesserte Löslichkeit zurückzuführen sein, was möglicherweise zu einer geringeren Interaktion mit dem MTT-Formazan Farbstoff führt. Neben der Funktionalisierung könnte auch die Anzahl der ineinander geschobenen Nanotube-Röhren hierbei eine Bedeutung haben. Zhang et al. (2007) konnte zeigen, dass SWCNTs im Vergleich zu doppelwandigen DWCNTs und MWCNTs den deutlichsten Effekt im MTT-Test hervorrufen.

Diese Beobachtung einer Interaktion und störenden Wirkung von Kohlenstoff im Vitalitätstest wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben und bestätigt. So wurde gezeigt, dass *Carbon Black* gängige Vitalitätstests (MTT, NeutralRot) verfälscht, indem der Farbstoff am Kohlenstoff adsorbiert wird (Monteiro-Riviere and Inman, 2006). Isobe et al. (2006) diskutieren in ihrer Arbeit sowohl die Möglichkeit der Adsorption zellulär wichtiger Proteine an *Carbon Nanotubes*, was letztlich zu einer „falsch positiven“ Aussage führen könnte, sowie die Möglichkeit der Reduktion der kolorimetrischen Messung von verschiedenen Vitalitätstests, wie dem MTT-Test, AlamarBlue-Test und der PI-Färbung, durch Anwesenheit von Kohlenstoff Nanoröhren. Eine Studie von Casey et al. (2007) untersuchte die Interaktionen von SWCNTs mit Bestandteilen des Zellkulturmediums und konnte dabei feststellen, dass es zu einer beträchtlichen unspezifischen Adsorption verschiedener Proteine an *Carbon Nanotubes* kam, ohne dabei den pH-Wert des Mediums zu verändern. Diese unspezifische Adsorption von Proteinen und Molekülen wird ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Collins and Avouris, 2000; Kong et al., 2000; Shim et al., 2002). Auch Davoren et al. (2007) konnten eine starke Interaktion von CNTs mit den Vitalitätsfarbstoffen in ihren Cytotoxizitäts-Experimenten beobachten.

Schließlich wurde die u.a. hier beschriebene und mikroskopisch gezeigte Interaktion von Kohlenstoff Nanoröhren mit dem MTT-Formazan Farbstoff in einer neuesten Studie von Casey et al. (2007) auch spektroskopisch untersucht und nachgewiesen. Die Gruppe untersuchte verschiedene Farbstoffe (CommassieBlue, AlamarBlue, NeutralRot, MTT,

WST-1), die in gängigen Cytotoxizitätsstudien mit *Carbon Nanotubes* verwendet werden und konnten beweisen, dass es mit allen verwendeten Farbstoffen zu Interaktionen mit SWCNTs kommt, was letztlich im Testsystem zu einem „falsch positiven“ Ergebnis führt. Zusammengenommen bestätigen diese Ergebnisse, dass gängige Vitalitätstests nicht für die quantitative Toxizitätsuntersuchung von CNTs geeignet sind und daher alternative Methoden dringend erforderlich sind.

Neben den hier beschriebenen Interaktionen von Kohlenstoff Nanopartikeln mit gebräuchlichen Vitalitätstests ist zudem beschrieben, dass MTT im zellfreien System durch Ascorbinsäure (Vitamin C) zu Formazan reduziert werden kann. Retinol (Vitamin A) katalysiert die Reaktion und fungiert dabei als Reduktase (Chakrabarti et al., 2000). In einem solchen zellfreien Testsystem konnte in Abhängigkeit von *Surfactants* eine Interaktion zwischen dem MTT-Formazan und unbehandelten SWCNTs festgestellt werden (Belyanskaya et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass nach Säure-Behandlung der CNTs der MTT-Test alleine durch die Anwesenheit von SWCNT a.t, im Enzym- und zellfreien System und in Abwesenheit von FCS im Medium aktiviert wird, was zu einem „falsch negativen“ Ergebnis führen kann. Aber auch aus Silikon bestehende Mikropartikel können den MTT-Test verfälschen, indem es zu Redoxreaktionen an den Partikeln kommt und es somit zu einer erhöhten „falsch negativen“ Aussage in Bezug zur Cytotoxizität dieser Partikeln kommen kann (Laaksonen et al., 2007).

Aufgrund der Ergebnisse aus den Vitalitätstests mit Kohlenstoff Nanoröhren kann von einem fehlenden bzw. sehr geringen akuten cytotoxischen Effekt bei Konzentrationen bis zu  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Inkubationszeiten bis zu 96h ausgegangen werden. Allerdings konnte eine Interaktion der CNTs mit dem MTT-Formazan festgestellt werden, was zu einem „falsch positiven“ Ergebnis führte. Eine Interaktion des MTT-Tests durch CNTs kann aufgrund der vorliegenden Hinweise zum einen durch die Durchführung und Methodik des Tests, dem Gebrauch von *Surfactants* sowie den verschiedenen CNT-Sorten beeinflusst werden (Belyanskaya et al., 2007). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass gängige Testsysteme durch die Verwendung von Partikeln, insbesondere von Nanopartikeln, verändert und gestört werden können und deshalb eine Überprüfung der Ergebnisse mit jeweils unterschiedlichen und unabhängigen Methoden unerlässlich ist.

---

### **5.3.2 Keine Apoptose Induktion durch Kohlenstoff Nanoröhren in humanen Lungenepithelzellen**

In Kenntnis der beschriebenen geringen akuten Cytotoxizität der *Carbon Nanotubes* sollte weiterhin zusätzlich auf mögliche frühe Anzeichen eines CNT-induzierten Einflusses auf die Zellvitalität geprüft werden.

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden drei Arten des Zelltodes beschrieben: der programmierte Zelltod (Apoptose), die Nekrose und die Autophagie. Mit dem Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (Abb. 4.5 (C)) konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer Anhäufung nekrotischer Zellen nach Exposition mit Nanotubes gekommen ist.

Für ultrafeines Carbon Black ist jedoch bekannt, dass es apoptotisch auf Lungenepithelzellen der Ratte wirkt (Sydlik et al., 2006).

Ähnlich wie bei der Zellvitalität nach *Carbon Nanotube* Exposition werden in der Literatur oft sehr widersprüchliche Ergebnisse für eine pro-apoptotische Wirkung von *Carbon Nanotubes* gezeigt. Einige Gruppen diskutieren eine erhebliche CNT-induzierte Apoptosewirkung sowohl für SWCNTs (Cui et al., 2005; Tian et al., 2006) als auch für MWCNTs (Bottini et al., 2006; Ding et al., 2005), während andere Gruppen keinerlei apoptotische Mechanismen nach CNT-Exposition feststellen können (Dumortier et al., 2006; Fiorito et al., 2005; Ghibelli et al., 2005; Shvedova et al., 2005).

Die Inkubation von A549 Zellen mit  $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) führte jedoch in dieser Studie zu keinem Zeitpunkt, weder nach SWCNT a.p., noch nach SWCNT a.t. Inkubation, zu einer signifikanten Apoptose-Induktion (Abb. 4.7).

Die Ergebnisse der Annexin V Analyse zeigen somit, zusammen mit den Resultaten des WST-1- und LDH-Tests sowie der PI-Färbung wiederum eindeutig, dass die in dieser Studie verwendeten Kohlenstoff Nanoröhren mit den verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiträumen keinerlei akut toxische Wirkung aufweisen. Es konnte weder ein nekrotischer noch apoptotischer Effekt in humanen Lungenepithelzellen nachgewiesen werden.

#### **5.4 Geringer Einfluss von Kohlenstoff Nanoröhren auf das Zellwachstumsverhalten**

Die Ergebnisse zur Cytotoxizität belegen klar, dass die verwendeten CNT-Materialien keine akut cytotoxische Wirkung auf Lungenzellen ausüben, da weder ein Einfluss auf die Zellmembranintegrität mittels Apoptose oder nekrotischer Mechanismen, noch eine Beeinträchtigung der Mitochondrien festgestellt werden konnte. Allerdings blieb unklar, ob andere zellphysiologisch relevante Parameter beeinflusst werden und in welcher Weise.

Es wurde gezeigt, dass Ultrafeinpartikel (UFP) und insbesondere deren Metallverunreinigungen zu einer Inhibierung der Zellproliferation von Lungenepithelzellen führen können (Okeson et al., 2003). Dieser Effekt konnte jedoch in der vorliegenden Studie mit *Carbon Nanotubes* nicht bestätigt werden. Die Behandlung der Zellen mit CNTs führte zu keiner Beeinträchtigung der Wachstumsrate sowohl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als auch innerhalb der verschiedenen CNT-Sorten (Abb. 4.8). Im Gegenteil konnte sogar eine leichte Wachstumssteigerung einiger CNT-inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden, welche nach 24h sichtbar wurde und sich im Verlauf der Inkubation von drei Tagen weiter ausprägte.

Neben der Überprüfung der Wachstumsrate von CNT-inkubierten A549 Zellen wurde auch die DNA-Neusyntheserate kontrolliert. Die Ergebnisse waren konform mit dem Wachstumsverhalten, denn es kam zu keiner Beeinträchtigung der DNA-Syntheserate, was sich in einer unveränderten Proliferationsrate von CNT-behandelten A549 Zellen in einem Zeitraum von drei Tagen widerspiegelte. Lediglich eine geringe Erhöhung der DNA-Synthese in SWCNT a.p.- und SWCNT a.t.-behandelten Zellen konnte auch hier gemessen werden (Abb. 4.9).

Für ultrafeines Carbon Black wurde bereits eine proliferative Wirkung auf Lungenepithelzellen der Ratte beschrieben (Sydlik et al., 2006). Für *Carbon Nanotubes* scheint es verschiedene Faktoren zu geben, die sowohl einen, wie hier gezeigten, geringen Proliferations-fördernden Einfluss (Garibaldi et al., 2006; Kam and Dai, 2005) als auch anti-proliferative Effekte hervorrufen können (Cui et al., 2005). Die Modifizierung der CNT-Oberfläche könnte dabei einen entscheidenden Einfluss ausüben.

Neben dem reinen zellphysiologischen Wohlbefinden der Zellen sind funktionelle Mechanismen vor allem im Entzündungsgeschehen von großem Interesse, wenn es um die Betrachtung von Nanopartikeln und ihren biologischen Wirkungen geht (Chou et al., 2008; Li et al., 2007; Mitchell et al., 2007; Shvedova et al., 2005) und soll im Folgenden betrachtet werden.

### **5.5 Oxidativer Stress – ein bedeutender Faktor in der Carbon Nanotube-induzierten Toxizität**

Unter normalen Umständen führt die oxidative Phosphorylierung der Energiegewinnung in den Mitochondrien sowie während der zellulären Immunantwort immer zu einer geringen Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche durch anti-oxidative Mechanismen, z.B. Glutathion (GSH) oder anti-oxidative Enzyme (z.B. HO-1), neutralisiert werden, so dass es zu keinem Ungleichgewicht und somit zu Oxidativem Stress kommen kann.

Geht die ROS-Bildung aber auf unphysiologische Einflüsse zurück und überschreitet bestimmte Grenzen, so kann diese zur Aktivierung und schließlich zur Transkription einer Reihe von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. Chemokinen (IL-8), Cytokinen (TNF- $\alpha$ ) und verschiedenen Enzymen (COX-2, iNOS) führen, die direkt oder indirekt Oxidativen Stress verstärken. Häufig geht der Entzündung in einem Gewebe, die Schädigung einzelner Zellen durch Oxidativen Stress voraus (Castranova, 2004; Dick et al., 2003; Eiserich et al., 1998; Fubini and Hubbard, 2003; Rahman, 2002).

Eine der krankheitsauslösenden Eigenschaften von Partikeln ist ihre Fähigkeit, Radikalbildung zu vermitteln, intrazellulär Oxidativen Stress auszulösen und die Aktivierung von Redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren, z.B. NF $\kappa$ B und MAPK einzuleiten (Hiura et al., 1999; Li et al., 2003; Völkel et al., 2003). Partikel-induzierter Oxidativer Stress kann entweder aufgrund katalytischer Reaktivität der Partikeloberfläche erfolgen, nach Stimulierung von Zellen oder durch ein Zusammenspiel beider Faktoren entstehen. Dabei konnte ein für Nanopartikel typisches Profil ermittelt werden, welches zeigt, dass es einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Größe, der Oberfläche und der Fähigkeit Oxidativen Stress zu induzieren, gibt (Brown et al., 2001; Donaldson et al., 2004; Koike and Kobayashi, 2006; Nel et al., 2006; Oberdörster et al., 2005). Durch Stone

et al. (2000) wurde die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies als Teil der zellulären inflammatorischen Antwort durch ultrafeines *Carbon Black* (14 nm) gezeigt, welches eine höhere Stress Antwort auslöst als die gleiche Masse an feinem *Carbon Black* (260 nm). Die Zunahme der Oberfläche bestimmt die potentielle Anzahl an reaktiven Gruppen, welche angelagert werden können. Dies kann wiederum eine Veränderung der Partikeleigenschaft und des oxidativen Potentials zur Folge haben. Metalle können diesen Effekt sogar noch verstärken.

Die Stellen, die im menschlichen Organismus mit Nanopartikeln in Berührung kommen, sind in erster Linie die Epithelien des Atemtraktes, des Gastrointestinaltraktes und der Haut. Dort wären hauptsächlich die Auswirkungen von Radikalen (Lipidperoxidation, DNA-Strangbrüche, Entzündungen) zu erwarten.

In der Literatur sind verschiedene Hinweise auf eine Induktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies nach Partikelaufnahme, z.B. von Ruß (Hiura et al., 1999) beschrieben. Auch bei Partikeln mit faserartigen Strukturen, wie dies die Nanoröhren aufweisen, ist ebenfalls Oxidativer Stress beobachtet worden. Martin et al. (1997) untersuchten die Bildung freier Radikale von Alveolarmakrophagen der Ratte nach Inhalation von Asbestfasern und beobachteten DNA-Schäden und Entzündungsvorgänge. Vergleichbare Wirkungen in der Radikal-Bildung konnten auch in den hier verwendeten humanen Lungenzellen durch CNTs ausgelöst werden (Abb. 4.10 (A)).

Der Nachweis von unspezifischen intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies erfolgte mithilfe von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA). In Gegenwart von ROS, wie z.B. Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, •OH, •O<sub>2</sub><sup>-</sup> wird der Farbstoff in das fluoreszierende DCF umgewandelt.

Auffallend bei dem Ergebnis der CNT-induzierten ROS war, dass es zu deutlichen Unterschieden in der ROS-Freisetzung im Vergleich der verschiedenen CNT-Materialien kam (Abb. 4.10 (A)). Nur diejenigen Zellen, die mit den verunreinigten NT-1 und SWCNT a.p. inkubiert waren, wiesen nach 24h-Inkubation eine annähernd dosisabhängige Erhöhung der gemessenen ROS-Freisetzung auf, die bis auf das Fünffache der unbehandelten Kontrolle anstieg und vergleichbar mit der *Carbon Black* Positivkontrolle war. Eine Behandlung der Zellen mit den aufgereinigten SWCNT a.t. und den funktionalisierten fSWCNT führte jedoch überraschenderweise zu keinerlei ROS-Bildung. Diese Beobachtung der CNT-induzierten ROS-Induktion konnte ebenfalls in der

Endothel-ähnlichen Zelllinie ECV304 gezeigt werden und wurde außerdem für Alveolarmakrophagen der Ratte beschrieben (Pulskamp et al., 2007).

In einer Studie von Sharma et al. (2007) konnte in Epithelzellen der Ratte festgestellt werden, dass der SWCNT-induzierte Oxidative Stress durch anti-oxidativ wirkende Substanzen, z.B. N-acetyl-L-cystein (NAC) vermindert werden kann. Diese Beobachtung konnte auch mit den verwendeten CNTs bestätigt werden. Die CNT-induzierte ROS-Freisetzung konnte auch in den hier untersuchten Zellen durch Zugabe von NAC reduziert werden. Allerdings zeigten wiederum die aufgereinigten SWCNT a.t. keinerlei Effekt auf die intrazelluläre Bildung von ROS (Abb. 4.10 (B)).

Der nachgewiesene Unterschied in der Induktion von ROS-Bildung durch die verschiedenen CNT-Fractionen legte nahe, dass die enthaltenen Verunreinigungen einen wesentlichen Anteil an dieser Wirkung haben können. Alle gängigen Synthesemethoden zur Herstellung von Kohlenstoff Nanoröhren resultieren neben dem *Carbon Nanotube* Produkt in einer Reihe von Verunreinigungen, z.B. amorpher Kohlenstoff und Metalle, welche als Katalysatoren für die Induktion von Oxidativem Stress dienen könnten (Donaldson et al., 2006; Halliwell, 1996).

### **5.5.1 CNT-Verunreinigungen als Auslöser des Oxidativen Stresses – indirekte CNT-Toxizität?**

Physikalisch-chemische Eigenschaften von Nanopartikeln, insbesondere die chemische Zusammensetzung sowie die katalytische Aktivität bestimmen die Fähigkeit, ROS zu induzieren (Limbach et al., 2007; Xia et al., 2006). Arbeitsplatzbezogene Studien konnten schon früh die Metalltoxizität von lungengängigen Partikeln, wie z.B. Kupfer, Vanadium, Nickel und Eisen zeigen (Dye et al., 1999; Mattson and Guidotti, 1980; Rastogi et al., 1992). Von Metallen wie Fe, Ni und Cu ist außerdem bekannt, dass sie ROS-Bildung durch Fenton-ähnliche Reaktionen und somit intrazellulären Oxidativen Stress auslösen bzw. verstärken können (Diabaté et al., 2002; Völkel et al., 2003), der entweder über einen direkten oder indirekten, extrazellulären Weg verläuft. Die Redox-Eigenschaften von Eisen machen es somit besonders bei der Produktion und dem Metabolismus von freien Sauerstoffradikalen bedeutsam. In der Industrie wurde die arbeitsplatzbezogene

Exposition mit eisenhaltigem Material mit einem erhöhten Risiko für Infektions- und Entzündungskrankheiten (Simonart et al., 2000) sowie für Lungenkrebs in Verbindung gebracht (Boyd et al., 1970).

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanotubes enthielten geringe prozentuale Anteile von Übergangsmetallen (Fe, Ni, Co), die ebenfalls einen Einfluss auf die Bildung von Oxidativem Stress ausüben könnten (Diabaté et al., 2002; Dreher et al., 2004; Völkel et al., 2003; Wilson et al., 2002). Laut chemischer Analyse (Tab. 3.3) enthielt z.B. die Sorte NT-1 0,009 Gewichts-% Eisen (Fe), 2,8 Gewichts-% Kobalt und sogar 4,2 Gewichts-% Molybdän. Eisen kann, wie oben beschrieben, über eine Fenton-Reaktion Sauerstoff-Radikale erzeugen. Shvedova et al. (2003) untersuchten den Einfluss von SWCNTs auf zellulärer Ebene in menschlichen Keratinozyten. Nach 18h Inkubation wurden reaktive Sauerstoffspezies und ein allgemeiner Verlust anti-oxidativer Reserven, wie z.B. Vitamin E gemessen. Die im Experiment von Shvedova et al. untersuchten SWCNTs enthielten allerdings bis zu 30 Gewichts% Eisen-Anteil.

Aufgrund der Unterschiede in der ROS-Induktion durch die verschiedenen *Carbon Nanotube* Materialien wurde weiterhin überprüft, ob auch zeitliche Differenzen in der ROS-Freisetzung durch diese Besonderheiten hervorgerufen werden. Hierfür wurden wiederum A549 Zellen zum einen für 10 Minuten, zum anderen für 24 Stunden mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) Nanotubes inkubiert und die reaktiven Sauerstoffspezies mithilfe der Umwandlung des  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  in den Fluoreszenzfarbstoff DCF quantitativ bestimmt. Die Abbildung 4.11 zeigt, dass es tatsächlich auch zu zeitlichen Unterschieden nach Kurzzeit (10min)- und Langzeitinkubation (24h) innerhalb der verschiedenen Kohlenstoff Nanoröhren kam. Die Säure-behandelten SWCNT a.t., die frei von amorphen Kohlenstoffresten sind und nur einen geringen Anteil an Metallverunreinigungen (1,3 Gewichts-% Kobalt und 1,2 Gewichts-% Nickel) besitzen, zeigten weder nach Langzeit (24h) noch nach Kurzzeitexposition (10min) der Zellen eine ROS-Induktion. Die DMF-aufgereinigten SWCNT a.p. sind frei von amorphem Kohlenstoff, besitzen aber noch einen hohen Anteil an Metallverunreinigung (4,3 Gewichts-% Nickel und Kobalt) und induzierten eine signifikante Bildung von ROS nach 24 Stunden, nicht aber nach 10 Minuten Inkubation. Dies zeigten nur die Zellen, die sowohl mit verschiedenen Metallen, als auch mit amorphem Kohlenstoff verunreinigten NT-1 behandelt wurden (siehe Tabelle 3.3). Dies war ein starker Hinweis darauf, dass die einzelnen Komponenten der CNT-

Verunreinigungen für die hier dargestellten Unterschiede in der ROS-Freisetzung verantwortlich sind.

Eine Behandlung der Nanotubes mit Dimethylformamide (DMF) wird in der Aufreinigung von Kohlenstoff Nanoröhren nach der Synthese häufig verwendet, um insbesondere amorphen Kohlenstoff von den intakten CNTs herauszulösen (Hennrich et al., 2003). Entsprechend wurden die hier verwendeten NT-1 ebenso mit DMF behandelt und die entstehenden NT-1 DMF Nanotubes auf ihre Fähigkeit, ROS zu induzieren, getestet.

Nach erfolgter DMF-Behandlung der NT-1 wurde das aufgereinigte NT-1 DMF Produkt mithilfe der TEM-Analyse charakterisiert und mit dem ursprünglichen NT-1 Material verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit Dimethylformamide tatsächlich zu einer Reduktion der Verunreinigung mit amorphem Kohlenstoff geführt hat. Im Vergleich zum Rohprodukt NT-1 treten die NT-1 DMF nun deutlicher und vereinzelter hervor und weisen optisch eine geringere Verunreinigung auf. Allerdings konnte auch eine erhöhte Anzahl an CNT-Bruchstücken festgestellt werden, die vermutlich auf die Durchführung dieser Aufreinigung zurückzuführen sind. Diese unabsichtlichen Veränderungen könnten zu weiteren Abweichungen in der zellulären Reaktion führen und müssen ebenso berücksichtigt werden. Reste von DMF im Material könnte z.B. auch zu einer höheren Löslichkeit der NT-1 DMF führen (Georgakilas et al., 2002).

Zur Überprüfung des Potentials der DMF-behandelten NT-1 (NT-1 DMF), Oxidativen Stress zu erzeugen, wurden wiederum A549 Zellen sowohl für 10 Minuten, als auch für 24 Stunden mit  $31,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) NT-1 DMF behandelt und die Reaktion der ROS-Freisetzung mit den übrigen CNTs verglichen (Abb. 4.13).

Tatsächlich zeigten die NT-1 DMF Nanoröhren nur noch nach 24h eine ROS-Bildung, welche mit den Ergebnissen von NT-1 und SWCNT a.p. vergleichbar war. Die kurzfristig ausgelöste ROS-Induktion nach 10 Minuten konnte jedoch durch das Herauslösen des amorphen Kohlenstoffs verhindert werden (Pulskamp et al., 2007).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass unterschiedliche CNT-Materialien und deren Synthese-bedingte Verunreinigungen tatsächlich eine bedeutende Rolle in der Toxizität von *Carbon Nanotubes* spielen und daher näher untersucht werden müssen.

Wie schon beim MTT-Test, wurden in jüngerer Vergangenheit Stimmen laut, dass die Testverfahren zum Nachweis von ROS nicht immer verlässlich sind (Bonini et al., 2006; Rota et al., 1999). Wichtige Kritikpunkte sind zum einen der Verdacht der

Selbstamplifikation des DCF-Tests aufgrund der Disproportionierung von  $\bullet\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , was in Anwesenheit von Peroxidasen wiederum mehr  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  zu DCF umwandelt, sowie zum anderen der fragwürdige Nachweis von  $\bullet\text{O}_2^-$  mithilfe dieses Tests. Aus diesem Grund wurde der mit dem DCF-Test nachgewiesene verzögerte „oxidative burst“ in humanen Lungenepithelzellen (A549) mithilfe zweier weiterer Methoden überprüft.

In Gegenwart von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) wird der Farbstoff Dihydrorhodamine123 (DHR) zum Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin123 oxidiert und kann direkt gemessen und quantifiziert werden. In Gegenwart von Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) kann es mit NO zur irreversiblen Bildung von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) kommen, welches u.a. Lipidperoxidation hervorrufen kann (Ho et al., 2002). Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) reagiert mit Tyrosinresten und es kommt zur Produktion von Nitrotyrosin, welches u.a. mit der Zerstörung des Cytoskeletts, der Inhibierung mitochondrialer Enzyme und Tumor-Promotion in Verbindung gebracht wird (Eiserich et al., 1998). Auch bei Asthma-Patienten wurde eine erhöhte Peroxynitrit Ausschüttung beobachtet (Saleh et al., 1998).

Dieser Test ergab, dass lediglich das NT-1 Produkt sowohl nach Kurzzeit (10min)- als auch nach Langzeitinkubation eine  $\text{ONOO}^-$  Bildung auslöste. Wie schon mittels des DCF-Tests gezeigt, konnte auch hier zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Reaktion nach SWCNT a.t Inkubation beobachtet werden (Abb. 4.14).

Der Nachweis eines weiteren reaktiven Sauerstoffradikals, dem Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), als Teil der ROS-Induktion und des daraus resultierenden Oxidativen Stresses, wurde fluoreszenzmikroskopisch über die Fluoreszenzentstehung durch DHE-Oxidation durchgeführt. Diese Methode belegte, dass nur CNTs mit einem hohen Verunreinigungsanteil (Metalle und amorpher Kohlenstoff) (NT-1) die intrazelluläre Freisetzung des Superoxidanions nach 10 Minuten und 24h induzieren können. Nach Entfernen des amorphen Kohlenstoffs (NT-1 DMF) kann der kurzfristig ausgelöste Stimulus der  $\bullet\text{O}_2^-$ -Freisetzung verhindert werden. Die Eliminierung der Metall-Verunreinigungen sowie des amorphen Kohlenstoffs in den Säure-behandelten CNTs (SWCNT a.t.) verhinderte gänzlich den „oxidativen burst“, unabhängig von der Inkubationszeit (Abb. 4.15).

Für ultrafeine Partikel mit Übergangsmetallen bzw. *Carbon Black* wurde beschrieben, dass es auch im zellfreien System zu einer ROS-Bildung kommen kann (Brown et al., 2001; Stone et al., 2000; Wilson et al., 2002). Der Zusammenhang zwischen der Größe von Partikeln und ihrer Oberfläche wird besonders bei Nanopartikeln deutlich, deren

Oberfläche sich mit abnehmendem Durchmesser enorm vervielfacht. Die Oberfläche ist zum Teil für die große Partikelreaktivität, insbesondere Redox-Reaktivität, der Nanopartikel verantwortlich (Koike and Kobayashi, 2006).

Tatsächlich konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass CNTs direkt, auch ohne zelluläre Mechanismen, in Abhängigkeit der Art und Menge ihrer Verunreinigungen dosis-abhängig reaktive Sauerstoffspezies generieren können (vgl. Abb. 4.16). Dies belegt, dass *Carbon Nanotubes*, ohne zusätzliche zelluläre Mechanismen schon für einen großen Anteil der gemessenen ROS verantwortlich sein könnten. Dass hierbei wiederum die Verunreinigungen der CNTs eine große Rolle spielen, zeigt sich in der hier wiederholt gezeigten fehlenden ROS-Bildung durch die aufgereinigten SWCNT a.t.

Aufgrund der Resultate zur CNT-induzierten ROS-Induktion kann den einzelnen Komponenten der Verunreinigungen von *Carbon Nanotubes* eine bedeutende Rolle in der potentiellen CNT-Toxizität zugesprochen werden und muss bei der Überprüfung weiterer toxikologischer Endpunkte berücksichtigt werden. Die mithilfe des DCF-Tests gewonnenen Daten der CNT-induzierten ROS-Freisetzung konnten durch weitere Testsysteme bestätigt werden und stehen weitestgehend im Einklang mit den Daten aus der Literatur. Kagan et al. (2006) konnten zwar weder mit unaufgereinigten noch mit Säure-behandelten SWCNTs intrazellulären Oxidativen Stress in murinen Makrophagen messen, dennoch wurden intrazelluläre anti-oxidative Systeme (GSH) aktiviert, wobei der Gehalt an Metallverunreinigung hier ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Kagan und seine Kollegen schließen daraus, dass CNTs, aufgrund ihrer Metallverunreinigungen, indirekt Oxidativen Stress auslösen können. Ebenso wurde eine fehlende NO-Ausschüttung in Makrophagen nach Inkubation mit Säure-behandelten SWCNTs berichtet (Fiorito et al., 2005; Shvedova et al., 2005). Die Schlussfolgerung daraus war, dass aufgereinigte CNT-Materialien ohne Metallkatalysatoren oder Graphitverunreinigungen kein potentielles inflammatorisches Potential besitzen. Auch Tian et al. (2006) berichten von einer fehlenden ROS-Freisetzung bzw. Oxidativem Stress nach Exposition mit aufgereinigten CNTs.

Für die Ursachen in der ROS/RNS-Bildung müssen die verschiedenen Eigenschaften der Partikel berücksichtigt werden. Dazu zählen die Oberfläche, die Reaktivitätseigenschaften der Oberfläche und die Anzahl der Partikel, sowie die chemische Zusammensetzung (Dick et al., 2003). Daraus folgt, dass die Toxizität von Kohlenstoff Nanomaterialien nur in

Verbindung mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Materials verstanden werden kann.

Gharbi et al. (2005) konnten sogar zum ersten Mal zeigen, dass eine Vorbehandlung mit C<sub>60</sub> Fullerenen sich anti-oxidativ auf die Leber von Ratten auswirkt. Ähnliche Beobachtungen sind auch für MWCNTs nach Säure-Behandlung beschrieben, die keine Freisetzung freier Sauerstoffradikale zeigen, sondern vermutlich vorhandene Radikale abfangen können, indem sie an die funktionalisierten Außenwände gebunden werden (Fenoglio et al., 2006).

### ***5.5.2 Die Freisetzung von ROS geht ohne Verlust des MMP einher – keine Beteiligung der Mitochondrien?***

Aus der Literatur gibt es Hinweise, dass UFP Mitochondrien schädigen können, indem sie Oxidativen Stress auslösen oder die Organellen durch direkten Kontakt beeinträchtigen (Li et al., 2003). Die Ursachen hierfür können laut Li et al. Ultrafeinstäube sein, die sich in Mitochondrien ablagern und vor Ort Oxidativen Stress induzieren, was letztlich zu Schäden führt. Sie diskutieren die Möglichkeit, dass durch die Bildung von ROS die mitochondriale Membran geschädigt wird und somit die Partikel in das Organell eindringen können. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass aufgrund der geringen Größe dieser Partikel der Durchtritt in die Mitochondrien generell möglich sei, wodurch ebenfalls Oxidativer Stress erzeugt wird, welcher die innere Mitochondrienmembran und somit das Mitochondriale Membranpotential (MMP) schädigen kann. Die Depolarisation der mitochondrialen Membran ist normalerweise das Resultat einer reduzierten Membran Permeabilität, dem Öffnen der Permeabilitätsporen und als Folge die Aktivierung von nekrotischen oder apoptotischen Signalwegen.

Nanopartikel verschiedenster Größe und chemischer Zusammensetzung wurden laut Literatur in den Mitochondrien gefunden und induzieren dort Schäden, welche letztlich zum Verlust des MMP führen (Li et al., 2003; Long et al., 2006; Long et al., 2007). Auch eine Silber-Nanopartikel Exposition von Rattenhepatocyten führte dosisabhängig zum Anstieg von ROS und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Hussain et al., 2005). Strukturelle sowie mitochondriale DNA-Schäden, sind ebenfalls nach Expositionen mesothelialer Zellen mit Asbestfasern beschrieben, welche aufgrund von Akkumulation in

Mitochondrien oder indirekt aufgrund ihrer Metallverunreinigungen und dem dadurch induzierten Oxidativen Stress die Schädigung hervorrufen (Shukla et al., 2003).

Obwohl die hier verwendeten CNTs nicht in Mitochondrien gefunden wurden, aber verunreinigte Nanotubes eindeutig die Fähigkeit besitzen, Oxidativen Stress zu induzieren, sollte daraufhin der Effekt der freigesetzten Radikale auf die Mitochondrien überprüft werden.

Die erzielten Ergebnisse beweisen jedoch, dass es zu keinem Zeitpunkt der Inkubation mit CNTs, weder nach NT-1-, noch nach SWCNT a.t.-Behandlung, zu einem Abfall des MMP in A549 Zellen gekommen ist, was wiederum eine fehlende Depolarisation bzw. Schädigung der mitochondrialen Membranintegrität durch *Carbon Nanotubes* bzw. der ROS-Freisetzung vermuten lässt. Die Art und Menge der unterschiedlichen CNT Verunreinigungen wiesen somit keinen Einfluss auf das MMP der Zellen in einem Zeitraum von bis zu vier Tagen auf (Abb. 4.17; 18).

## **5.6 CNT- Wechselwirkungen mit inflammatorischen Signalwegen – die NF $\kappa$ B-Aktivierung**

Eine Entzündungsreaktion wird durch eine Reihe von intrazellulären und extrazellulären Signalen kontrolliert und gesteuert. Bestandteil dieser pro-inflammatorischen Signale sind Cytokine, die von Immunzellen ausgeschüttet werden und auto-, para- und endokrin wirken können.

Pro-inflammatorische Effekte in Form von IL-8, IL-1 und TNF- $\alpha$  Ausschüttung in humanen Endothelzellen und Makrophagen wurden auch nach Nanopartikelexposition (Co, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>) beschrieben (Lucarelli et al., 2004; Peters et al., 2004). Verschiedene Studien mit Fullerenen konnten außerdem nachweisen, dass die Exposition von Makrophagen zu einer Erhöhung der Cytokinkonzentration (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) führt (Adelmann et al., 1994).

Für die Exposition mit Kohlenstoff Nanoröhren sind zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich ihres inflammatorischen Potentials bekannt. Eine erhöhte IL-8 Ausschüttung in humanen Keratinocyten nach Inkubation mit unmodifizierten MWCNTs wurde zum Beispiel beschrieben (Monteiro-Riviere et al., 2005), während Murr et al.

(2005) keine Induktion von IL-10 und IL-12 in Makrophagen nach SWCNT Stimulation feststellen konnten. TNF- $\alpha$ , das bekannt für seine pathologische Wirkung in Partikel-induzierten Entzündungen ist, konnte in Makrophagen nach Inkubation mit MWCNT Bruchstücken nachgewiesen werden (Muller et al., 2005). Intakte MWCNTs hingegen hatten nur einen sehr geringen Effekt auf die inflammatorische Antwort. Ebenfalls eine geringe Freisetzung von TNF- $\alpha$  wurde in murinen Makrophagen (Shvedova et al., 2005) sowie in Alveolarmakrophagen der Ratte (Pulskamp et al., 2007) nach Exposition mit SWCNTs und MWCNTs festgestellt. Funktionalisierte SWCNTs induzieren geringe Mengen an IL-6 und IL-8 Freisetzung in humanen Kernatinocyten, die sogar noch höher liegen könnten, aber aufgrund der Proteinadsorption an der Oberfläche von CNTs evtl. abgefangen werden (Zhang et al., 2007). Unspezifische Adsorption von Proteinen und Molekülen an CNTs ist mehrfach beschrieben und könnte die Messung von pro-inflammatorischen Mediatoren verfälschen (Collins and Avouris, 2000; Salvador-Morales et al., 2006; Shim et al., 2002; Wong et al., 1998).

Shukla et al. (2000) beschreiben in ihren Studien, dass nach Inhalation von PM<sub>2,5</sub> in Lungenzellen von Mäusen eine erhöhte Genexpression von NF $\kappa$ B-abhängigen pro-inflammatorischen Mediatoren sowie Cytokinen nachgewiesen wurde. Weiterhin konnte die Gruppe einen Zusammenhang zwischen dem oxidativen Potential der Partikel und der NF $\kappa$ B-Aktivierung feststellen. In ähnlicher Weise könnten CNTs die inflammatorische Antwort und Cytokin-Ausschüttung beeinflussen, um so Entzündungsmechanismen einzuleiten, zu verändern oder sogar zu verstärken. Ding et al. (2005) und Sarkar et al. (2007) konnten ebenfalls durch eine Genexpressionsanalyse dokumentieren, dass eine Vielzahl von inflammatorischen- und Stress-induzierten-Genen nach Inkubation mit MWCNTs bzw. SWCNTs hochreguliert werden. Eine mögliche Schlussfolgerung dabei ist, dass CNTs aufgrund ihrer Dimension eine ähnliche zelluläre Antwort wie bei einer Virusinfektion hervorrufen können, da ein ganz ähnliches Expressionsmuster beobachtet werden konnte. Außerdem gibt es einige Hinweise darauf, dass Metalle, z.B. Vanadium und Chrom in nicht cytotoxischen Konzentrationen, Einfluss auf die Aktivität von NF $\kappa$ B haben könnten (Chen et al., 2001; Kaltreider et al., 1999). Auch von einer p65 Translokation *in vitro* und *in vivo* in Ratten nach Asbestinhalation ist berichtet worden (Janssen et al., 1997).

In Kenntnis der vorliegenden Ergebnisse und Hinweise aus der Literatur wurde der NF $\kappa$ B-Weg in dieser Arbeit näher untersucht. Hierzu erfolgte mithilfe des Western Blots

zunächst die Überprüfung einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B über dessen Translokation in den Kern. Für die folgende Versuchsreihe wurden Endothel-ähnliche Zellen, die ECV304, verwendet, da A549 Zellen im unstimulierten Zustand ein hohes basales Level von p65 im Kern aufweisen und deshalb für diese Versuchsreihe ungeeignet sind (Chen et al., 2004; Malhotra et al., 2001).

Die Partikel-behandelten Zellen, unabhängig vom jeweiligen verwendeten Material, Art und Menge der Verunreinigung, weisen im Cytosol eine leichte, aber stetige Abnahme der p65 Konzentration auf (Abb. 4.19). Gleichzeitig kann man ab dem 1h bzw. 2h Zeitpunkt eine Zunahme von p65 im Kern, ebenfalls unabhängig von den eingesetzten Partikeln, erkennen. Im Vergleich zu den NT-1 und CB14 behandelten Zellen wiesen die aufgereinigten SWCNT a.t. behandelten Zellen jedoch nur einen sehr geringfügigen Anstieg von p65 im Kern auf, was darauf hindeutet, dass es unterschiedliche Mechanismen in der Aktivierung von p65 für die verschiedenen Materialien geben kann.

Die Exposition von humanen Keratinocyten mit SWCNTs führte in der Studie von Manna et al. (2005) ebenfalls zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B nach nur zwei Stunden. Die nachfolgenden Untersuchungen ergaben weiterhin, dass diese Aktivierung aufgrund von Signalkaskaden geschieht, die sowohl MAPK als auch die Aktivierung des I $\kappa$ B Komplexes beinhaltet. Auch in einer murinen Makrophagen Zelllinie konnte nach 24h SWCNT-Inkubation eine deutliche Translokation von NF $\kappa$ B beobachtet werden (Chou et al., 2008).

NF $\kappa$ B ist ein Redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, der durch verschiedene oxidative Stimulanzen aktiviert werden kann. Eine Studie von Rahman et al. (2002) ergab, dass ROS sowie TNF- $\alpha$  zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B mit anschließender IL-8 Induktion in Lungenepithelzellen führen. Oxidativer Stress führte somit zu einer pro-inflammatorischen Zellantwort. Auch für Endothelzellen ist bekannt, dass eine NF $\kappa$ B Translokation in den Kern zum Teil von ROS abhängig ist (Chan and Murphy, 2003).

Die bisherigen Resultate belegen eindeutig, dass Kohlenstoff Nanoröhren reaktive Sauerstoffspezies induzieren können und somit zu erhöhtem Oxidativen Stress beitragen. Die Art und Menge der Verunreinigungen spielen dabei eine wichtige Rolle und führen u.a. zu quantitativen als auch zu zeitlichen Unterschieden in der gemessenen ROS-Freisetzung. Weiterhin wurde festgestellt, dass sowohl NT-1 als auch SWCNT a.t. eine zunehmende Translokation der NF $\kappa$ B Untereinheit p65 in den Kern bewirken. Ein wichtiger Teil der nachfolgenden Untersuchung bestand in der Analyse der CNT-

---

induzierten NFκB Aktivierung, in Abhängigkeit der Fähigkeit Oxidativen Stress zu induzieren. Dabei könnten wiederum die unterschiedlichen Verunreinigungen eine große Rolle spielen. Zhou et al. (2003) konnten in ihren Studien mit Ratten feststellen, dass die alleinige Exposition durch Inhalation mit Ruß oder ultrafeinen Eisenpartikeln zu keinen respiratorischen Effekten führte, jedoch induzierte die gleichzeitige Verwendung dieser beiden Komponenten als Gemisch eine signifikant erhöhte ROS-Freisetzung, eine Erhöhung von IL-1β, Cytochrom P450 sowie eine Aktivierung von NFκB. Diese Ergebnisse lassen eine synergistische Wirkung von Ruß und Metallpartikeln vermuten.

Die durch NT-1 induzierte Translokation des NFκB konnte zum einen durch NAC erheblich reduziert werden, während die gleichzeitige Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Aktivierung verstärkte (Abb. 4.21). Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutungen, dass ROS bei der NT-1-induzierten Aktivierung des NFκB-Signalweges eine bedeutende Rolle spielen. Die Inkubation der Zellen mit SWCNT a.t. führte ebenfalls wie zuvor beschrieben zu einer geringen p65 Translokation, die jedoch durch Co-Inkubation mit dem Antioxidanz NAC nicht reduziert werden konnte, während die Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erneut eine erhöhte Translokation zur Folge hatte. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass es neben der ROS-abhängigen NFκB-Aktivierung noch weitere Mechanismen der CNT-induzierten p65 Translokation geben muss.

Auch die Exposition humaner Lungenzellen mit UFP führt zu einer Aktivierung von NFκB, welche durch Zugabe von Antioxidantien und Metallchelatoren verringert werden kann (Chung et al., 2007; Dye et al., 1999; Kennedy et al., 1998; Manna et al., 2006; Quay et al., 1998). Diese Beobachtungen unterstützen die hier dargestellten Ergebnisse einer CNT-induzierten NFκB-Aktivierung, welche von der Fähigkeit der Kohlenstoff Nanoröhren, reaktive Sauerstoffspezies zu induzieren, abhängt.

In der Literatur finden sich einige Hinweise auf eine ROS-induzierte NFκB Aktivierung. So stellen Ryan et al. (2004) fest, dass Oxidativer Stress in den NFκB Signalweg eingreifen kann, und dass vermutlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt IκB Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert werden (Kamata et al., 2002). Ein weiterer Hinweis, dass ROS die NFκB-Aktivierung über vorgeschaltete Kinasen induzieren könnte, ist die erhöhte IKK-Aktivität in humanen Epithelzellen und murinen Fibroblasten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung (Jaspers et al., 2001; Yin et al., 2000). Auch Gloire et al. (2006) vermuten, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte NFκB-Aktivierung hauptsächlich auf IKK-Aktivierung beruht, auch wenn die redox-

sensitiven Signalwege, die zu dieser Aktivierung führen, noch weitgehend unbekannt sind sowie Zelltyp-abhängig zu sein scheinen.

Die Literaturdaten, zusammen mit den Inhibitionsversuchen mit NAC könnten die hier gezeigte ROS-abhängige p65 Translokation nach NT-1-Inkubation erklären und auf mögliche Angriffspunkte von NT-1 bzw. NT-1-induzierte ROS in der NFκB-Signalkaskade hindeuten. Dennoch bleibt weiterhin die Frage offen, auf welcher Ebene die Aktivierung von p65 durch die aufgereinigten SWCNT a.t. stattfindet, da hier ein Einfluss von ROS ausgeschlossen werden konnte.

Eine Möglichkeit der Aktivierung des NFκB-Signalweges ist die Rezeptorebene, wobei insbesondere die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) von großer Bedeutung sind. TLRs sind Transmembranproteine und stellen eine der immunologisch wichtigsten Rezeptorfamilien dar. Sie erkennen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Liganden, die nach erfolgreicher Bindung an den Rezeptor und Aktivierung zu einer Signalkaskade führen. Dabei kommt es letztlich zur Aktivierung von z.B. NFκB und damit zur Induktion von pro-inflammatorischen Genen.

In der Partikel-induzierten inflammatorischen Antwort scheint speziell der TLR4 Rezeptor eine wichtige Rolle zu spielen (Cho et al., 2005; Inoue et al., 2006). So konnte z.B. gezeigt werden, dass es nach Exposition von Lungenzellen mit UFP zu einer veränderten Expression von TLR4 und TLR2 kommt, was zu einer verringerten Sensitivität gegenüber LPS führen könnte (Becker et al., 2005; Becker et al., 2005). Auch Metalloxid-Nanopartikel verändern die Expression von TLRs in Makrophagen was bedeuten könnte, dass Nanopartikel einen bedeutenden Einfluss auf die TLR-abhängige inflammatorische Antwort ausüben (Lucarelli et al., 2004). Außerdem ist bekannt, dass viele Entzündungs- und Immunkrankheiten eine Folge einer veränderten TLR Regulation sind (Kerfoot et al., 2004; Kolek et al., 2004).

Vor diesem Hintergrund konnte ein Zusammenhang zwischen der NFκB-Aktivierung durch CNTs und einer TLR4 Rezeptor-Aktivierung und dem MyD88-abhängigen Signalweg vermutet werden. Für verschiedene Zellen wurde beobachtet, dass die Expression von TLRs nicht allein konstitutiv ist, sondern durch Zellaktivierung transkriptionell und auf Proteinebene reguliert wird (Lien and Ingalls, 2002).

Die nachweisbare Aktivierung von NFκB nach nur einer Stunde Partikelinkubation, führte zu der Annahme, dass die Initiierung des Signalweges zu einem sehr frühen Zeitpunkt

stattfinden muss. Die Proteinanalytik ergab jedoch, dass keine der eingesetzten CNTs in einem Zeitraum von einer Stunde eine erkennbare Veränderung in der Proteinexpression von TLR4 und MyD88 hervorrufen konnte (Abb. 4.23). Es wurden vereinzelt leichte Schwankungen in der TLR4- und MyD88-Proteinkonzentration beobachtet, die aber statistisch nicht signifikant waren. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass normalerweise die Genexpression und Proteinsynthese nicht in einem so kurzen Zeitraum ablaufen kann, wurden zusätzlich auch längere Inkubationszeiten von bis zu 24h überprüft. Allerdings zeigte sich auch hier kein verändertes Bild in der TLR- und MyD88-Proteinkonzentration nach CNT-Behandlung.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Expression des TLR4 Rezeptors in ECV304 Zellen durch die *Carbon Nanotube*-Exposition auf Proteinebene nicht verändert wird und somit die CNT-induzierte p65-Aktivierung über diesen Rezeptor wenig wahrscheinlich ist. Auch die Expression des TLR4 Adaptorproteins MyD88 war nicht verändert, was diese Vermutung weiterhin bestätigt. Allerdings kann aufgrund dieser Beobachtung eine p65-Aktivierung durch eine CNT-Interaktion mit Oberflächenrezeptoren nicht generell ausgeschlossen werden, da die Möglichkeit der Wechselwirkung mit weiteren TLRs oder aber des EGF-Rezeptors besteht. So ist zum Beispiel bekannt, dass Eisen-enthaltende Partikel NFκB über einen EGF vermittelten Signalweg in Epithelzellen aktivieren können (Churg et al., 2005). Entscheidend scheint dabei nicht die Partikelaufnahme, sondern die Anwesenheit von Metall und ROS zu sein. As, Cu, V und Zn können ebenfalls den EGF-Rezeptor in Lungenzellen aktivieren (Wu et al., 1999). Es wird spekuliert, dass diese Metalle direkt auf Rezeptorebene interagieren und so eine Strukturänderung und Aktivierung des Rezeptors hervorrufen. Eine UFP-induzierte Aktivierung von NFκB wird ebenfalls durch den PI3K/Akt Signalweg vermittelt (Ma et al., 2004), der auch bei der LPS-induzierten NFκB Aktivierung in Endothelzellen eine wichtige Rolle spielt (Li et al., 2003).

In ähnlicher Weise könnten auch CNTs auf den NFκB-Signalweg einwirken wobei hierbei die metallischen Verunreinigungen sowie die Oberflächenmodifikationen nach Säure-Behandlung von Bedeutung sein könnten.

Wie genau es zu dieser Aktivierung durch CNTs kommt und auf welcher Ebene die Nanoröhren direkt, z.B. auf Rezeptorebene bzw. indirekt durch die CNT-induzierten ROS die Signalkaskade beeinflussen, muss zu diesem Zeitpunkt noch offen bleiben und weiterhin geklärt werden.

---

## **5.7 Veränderungen im Adhäsionsverhalten und zelluläre morphologische Umgestaltung nach Nanotube-Inkubation – Kohlenstoff Nanoröhren als neuartiges Zellsubstrat?**

Die Zelladhäsion wird durch die Wechselwirkung zwischen Proteinen des Cytoskeletts, der „*Focal Adhesions*“ sowie des Substrates bestimmt. Die Anzahl, Größe und Art der „*Focal Adhesion*“-Komplexe korreliert wiederum mit anderen zellulären Parametern wie z.B. Proliferation, Aktivität, Motilität und Organisation des Cytoskeletts. „*Focal Adhesions*“ übertragen ebenso Veränderungen von intra- oder extrazellulären Spannungen auf Signalwege, die erneut die Art und Menge von „*Focal Adhesions*“ regulieren und somit auch als mechanische Sensoren der Zelle dienen (Wang and Ingber, 1995).

Lichtmikroskopische Aufnahmen von A549 Zellen, die 24h mit Kohlenstoff Nanoröhren behandelt wurden, weisen an der Zellmembran anhaftende *Carbon Nanotubes* auf und konnten, wie die von Davoren et al. (2007) beschriebenen SWCNT-Aggregate auf der Zelloberfläche von A549 Zellen, nur sehr schwer entfernt werden. Auffällig war dabei die Bildung von CNT-Zell-Agglomeraten, welche auch in anderen Studien mit *Carbon Nanotubes* gesehen wurden (Cui et al., 2005; Garibaldi et al., 2006; Nimmagadda et al., 2006; Zhang et al., 2007) und sogar nach Kontakt von Zellen der Reispflanze (*Oryza sativa L.*) mit MWCNTs beobachtet werden konnten (Tan and Fugetsu, 2007). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass der Kontakt mit CNTs zu einem veränderten Adhäsionsverhalten der Zellen führt.

Es ist bekannt, dass bestimmte Proteine der „*Focal Adhesion*“-Komplexe, z.B. FAK und Vinculin, eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und Regulation der Zellmorphologie spielen (Leong et al., 1995). Aus diesem Grund wurde zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens und von strukturellen Veränderungen humaner Lungenepithelzellen nach SWCNT-Kontakt die Art und Menge sowie die Verteilung von „*Focal Adhesions*“ und das Expressionsverhalten dieser Proteine untersucht.

Zunächst konnte durch Anfärben des Aktin Cytoskeletts mit Rhodamine Phalloidine eine eindeutig erhöhte Fluoreszenzmarkierung der CNT-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachtet werden, die besonders an den CNT-Zell-Agglomeraten deutlich hervortrat (Abb.4.26). Eine genauere fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte weiterhin eine deutliche Kondensation von Aktin und Ausbildung von Stressfasern sowie „*Focal Adhesions*“, die besonders in Zellen ausgeprägt waren, die

in direktem Kontakt mit Nanotube Bündeln standen. Dies deutet auf einen aktiven Prozess der hier beobachteten Agglomeration von A549 Zellen mit CNTs hin. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen nach CNT-Kontakt scheinbar aus dem Monolayer herauslösen, um am Nanotube-Gerüst zu adhären und dieses fest zu umschließen.

Die gezeigten Ergebnisse belegen, dass SWCNT a.t. tatsächlich das Zelladhäsionsverhalten und die zelluläre Struktur des Aktin Cytoskeletts von Lungenepithelzellen beeinflussen und verändern können. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Fibroblasten und Kardiomyocyten nach SWCNT Kontakt gemacht werden (Garibaldi et al., 2006; Tian et al., 2006) und könnten die *in vivo* beschriebenen Granulomata in Lungengewebe von Mäusen und Ratten nach intratrachealer Lungen-Instillation von CNTs erklären (Chou et al., 2008; Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004). Andere Gruppen konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass der Einfluss von SWCNTs auf die Zelladhäsion abhängig vom Verunreinigungsgrad, der Partikelkonzentration sowie der verwendeten Zelllinie ist (Kaiser et al., 2007). Auch mikroskopische Beobachtungen von humanen Keratinocyten nach SWCNT-Inkubation zeigten eine umstrukturierte Zellmorphologie mit Zellseparation vom Monolayer und einer veränderten Oberflächenhomogenität des Zellverbandes sowie dosisabhängige Veränderungen des F-Aktins (Shvedova et al., 2003). Das Zelladhäsionsverhalten von humanen Nierenzellen wird ebenfalls durch SWCNT-Behandlung verändert. Die Genexpressionsanalysen der Gruppe von Cui et al. (2005) demonstrieren eine verminderte Aktivierung von Adhäsions-regulierenden Genen der extrazellulären Matrix (Laminin, Fibronectin). Dies führt, so Cui et al., zu einer Ausdünnung der basalen Zellmembran und folglich zu der beobachteten Verminderung der Zelladhäsion. SWCNTs waren auch hier als große Agglomerate und Bündel zu sehen, die teilweise an den Zellen hafteten und zu einer Zellaggregation führten. Cui et al. schlussfolgern aus ihren Beobachtungen, dass die extrazelluläre Wechselwirkung von CNTs mit der Zellmembran Signale induzieren, die schließlich in der Zelle zu einer Veränderung der Genexpression führen kann.

Eine der wichtigsten Kinasen in der Bildung und Regulation von „*Focal Adhesion*“-Kontakten wird durch die „*Focal Adhesion*“ Kinase (FAK) repräsentiert. FAK ist eine cytoplasmatische 125-kDa große Tyrosin-Kinase und ein wichtiger Regulator der „*Focal Adhesion*“-Aktivierung und Komplexbildung mit Proteinen des Aktin Cytoskeletts, z.B. Vinculin (Schaller et al., 1992). FAK wird außerdem in Verbindung mit mechano-

sensorischen Eigenschaften gebracht, da FAK-Phosphorylierung nach Stimulierung von Endothelzellen durch Zugkräfte beobachtet werden konnte (Yano et al., 1996). Aus diesem Grund wurde zur weiteren Untersuchung des Adhäsionsverhaltens und der strukturellen Veränderungen von humanen Lungenepithelzellen nach SWCNT a.t. Kontakt, das Expressions- und Aktivitätsverhalten von FAK und Vinculin mithilfe des Western Blots näher untersucht (Abb. 4.27).

Hierbei zeigte sich, dass es tatsächlich nach einer sechsständigen bzw. 24-stündigen Inkubation mit SWCNT a.t. zu einer geringfügigen Aktivierung von FAK im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kam. Gleichzeitig konnte nach 48h ein erhöhtes Expressionsmuster von Vinculin in den CNT-behandelten Zellen beobachtet werden, was wiederum für eine Aktivierung der „*Focal Adhesion*“-Signalkette durch die Behandlung mit SWCNT a.t. spricht.

Viele der möglichen biomedizinischen Applikationen für *Carbon Nanotubes* im Bereich der Geweberegeneration bedeuten, dass die angrenzenden Zellen in direktem Kontakt mit Kohlenstoff Nanoröhren stehen. Dementsprechend notwendig ist nicht nur die Toxizitätsuntersuchung, sondern auch die Erforschung einer möglichen Biokompatibilität der CNTs. Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung sind dabei wichtige Parameter zur Überprüfung von z.B. künstlichem Gewebematerial als extrazelluläre Matrix. Die Oberflächentopographie, unterteilbar in Makro-, Mikro- und Nanotopographie spielt dabei eine wichtige Rolle und beeinflusst die zelluläre Interaktion mit dem Material (Curtis and Wilkinson, 1998). Industriell hergestellte Substrate bieten eine künstliche extrazelluläre Matrix für Zellen im *in vitro* System und sind von großer Bedeutung für die Regenerative Medizin und Implantatmedizin. Kommt die Zelle in Kontakt mit dem künstlichen Biomaterial, werden Signale in Abhängigkeit von sowohl der chemischen Beschaffenheit als auch der Topographie über Transmembranrezeptoren, den Integrinen, ins Innere der Zelle geleitet, um Zelladhäsion, Wachstum und Differenzierung zu steuern.

Kohlenstoff eignet sich aufgrund des hohen Verschleißwiderstandes, kleinem Reibungskoeffizient, geringer chemischer Reaktivität und guter Biokompatibilität zur Verwendung künstlicher Substrate und wird bereits in der Implantations- und Regenerationsmedizin verwendet (Allen et al., 2001; Schröder et al., 2000). Das extreme Verhältnis von Oberfläche zu Masse macht *Carbon Nanotubes* besonders attraktiv als Komponenten in Faser-verstärkten Kollagen Compositen. Dies verspricht eine

Verbesserung der mechanischen und elektrischen Eigenschaften des Materials für eine Reihe von Anwendungen, wie z.B. in der Geweberegeneration (Hourdin et al., 2002; Lovat et al., 2005; MacDonald et al., 2005). MacDonald et al. berichten in ihren Studien mit Muskelgewebszellen, die auf einer Kollagen-fCNT Matrix ausgesät wurden, von einer hohen Biokompatibilität. Insbesondere in der Regeneration von Knochensubstanz scheinen *Carbon Nanotubes* viel versprechend zu sein. Die *in vitro* Tests von Chlopek et al. (2006) und Balani et al. (2007) mit humanen Osteoblasten und Fibroblasten konnten zeigen, dass CNTs eingearbeitet in einer Polymermatrix eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Insbesondere die erhöhte Bildung von Kollagen auf CNT Oberflächen verspricht eine potentielle Anwendung in der Geweberegeneration. Auch Zanello et al. (2006) untersuchten in ihrer Studie die Aktivierung von Osteoblasten auf einem *Carbon Nanotube* Substrat und berichteten, dass CNTs eine hohe Biokompatibilität aufweisen, aber auch Einfluss auf die Zellmorphologie der Zellen haben.

Nicht nur die chemische Beschaffenheit eines Substrats, sondern auch die Topographie scheint eine wichtige Rolle zu spielen sowohl bei der Absorption von Proteinen der EZM als auch der Zelladhäsion. Yamamoto et al. (2007) verwendeten in ihrer Studie ein wabenartig strukturiertes Substrat und konnten feststellen, dass sich Fibronectin entsprechend der Topographie an das Substrat anlagerte und es zu einem veränderten Adhäsionsverhalten von Endothelzellen kam. Dabei konnte eine vermehrte Bildung von „*Focal Adhesions*“ an den Rändern der Mikroporen sowie eine verstärkte FAK-Aktivierung festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien mit nanostrukturierten Titanoberflächen. Auch hier konnte eine erhöhte Zelladhäsion, vermehrtes Auftreten von „*Focal Adhesions*“ und Stressfasern beobachtet werden (Dalby et al., 2000; Lu et al., 2008; Okumura et al., 2001). Eine Veränderung der Zellmorphologie mit einer Ausrichtung der Zellen entlang der Substrat-Struktur mit ausgeprägten Zellfortsätzen wurde bei Osteoblasten auf einer CNT-Membran beobachtet (Giannona et al., 2007). Die Zellen scheinen die Nanotopographie der CNT-Oberfläche zu erkennen und entsprechend darauf zu reagieren. Giannona et al. diskutieren die Möglichkeit der Imitation von EZM Strukturen durch CNTs, um so Signalwege der Zelladhäsion zu aktivieren.

Neben der chemischen Beschaffenheit und der Topographie, könnte aber auch die Adsorption von Proteinen an das künstliche Substrat einen bedeutenden Einfluss auf das

Zelladhäsionsverhalten ausüben. So untersuchten Meng et al. (2005) die Adsorption von humanen Serum Proteinen an SWCNTs und konnten dabei feststellen, dass es zu einer sehr starken Anlagerung von Plasmaproteinen und Fibrinogen kommt, während Albumin nur geringfügig an CNTs gefunden wurde. Die Art der Proteinanlagerung bestimmt dabei sowohl die Adhäsion spezifischer Zellen als auch ihre Aktivierung (Aoki et al., 2006; Higuchi et al., 2003). Diese ist wiederum abhängig von verschiedenen Oberflächeneigenschaften des Materials wie z.B. die chemischen und topographischen sowie die Hydrophobizität und Hydrophilität, welche die Art und Weise der Proteinanlagerung beeinflussen können.

Des Weiteren konnten bisherige Studien zeigen, dass die EZM-abhängige Umgestaltung der Zellmorphologie sowie dreidimensionale Substrate die Signalwege von Integrinrezeptoren beeinflussen und somit zelluläre Funktionen verändern (Sinha et al., 1994). Viele Studien belegen, dass kultivierte Zellen in einem zweidimensionalen Umfeld unterschiedliches Verhalten, im Vergleich zu einer dreidimensionalen zellulären Umwelt, zeigen (Green and Yamada, 2007). Lenardi et al. (2006) diskutieren die Möglichkeit, dass ein dreidimensionales Gerüst im Nanometerbereich Proteine der EZM spezifischer der Zelle präsentieren und es ebenfalls zu einer erhöhten Integrininteraktion kommt. Dies wiederum würde zu einer Umgestaltung der Zellmorphologie und des Adhäsionsverhaltens führen. Aufgrund der vergrößerten Oberfläche des nanostrukturierten Kohlenstoff-Substrats entsteht eine höhere Kontaktfläche für die Zellen, die zur Adhäsion zur Verfügung steht. Eine weitere Möglichkeit könnte die physikalische Beschaffenheit des Nanogerüsts sein. Es wurde beschrieben, dass „*Focal Adhesions*“ als mechanische Sensoren dienen, die entsprechend der Festigkeit und Flexibilität des Substrates reagieren können.

In dieser Arbeit konnte eine deutliche Veränderung im Adhäsionsverhalten von humanen Lungenepithelzellen nach CNT-Kontakt festgestellt werden. Diese Beobachtung konnte fluoreszenzmikroskopisch in einer gesteigerten Formation von Stressfasern und „*Focal Adhesions*“, sowie in der Aktivierung der „*Focal Adhesion*“ Kinase und des Adaptorproteins Vinculin, nachgewiesen werden. Die Dreidimensionalität des CNT-Gerüsts, welches sich als ein attraktiveres Zellsubstrat anbietet, könnte einer der Gründe für das beobachtete Zellverhalten sein. Andere hier diskutierte Möglichkeiten sind die Nanotopographie, die unspezifische Adsorption von Proteinen an der Oberfläche sowie

die chemische Zusammensetzung und Reaktivität der Kohlenstoff Nanoröhren. Wahrscheinlich ist ein synergistisches Zusammenspiel dieser hier genannten Faktoren, das zu den beobachteten zellulären Veränderungen führt. Eine weitere Möglichkeit ist die intrazelluläre Stimulierung und Aktivierung der „*Focal Adhesion*“-Signalkette nach CNT-Inkubation. So ist z.B. bekannt, dass NFκB eine Rolle in der Transkriptionsregulation von FAK spielt (Golubovskaya et al., 2004). Andererseits können die GTPasen der Rho Familie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1 und NFκB, regulieren und stimulieren (Minden et al., 1995; Perona et al., 1997). Somit könnte hier eine Verbindung zwischen der in dieser Arbeit gezeigten NFκB-Aktivierung und der Formation von „*Focal Adhesions*“ und Stressfasern bestehen. Dies muss allerdings weiter geklärt werden.

Zusammen mit der hohen Biokompatibilität und der fehlenden akuten Cytotoxizität der *Carbon Nanotubes* könnte sich eine Möglichkeit der potentiellen Anwendung von Kohlenstoff Nanoröhren als attraktives künstliches Zellsubstrat eröffnen. Allerdings müssen dabei die Vorteile genauestens mit den möglichen Gefahren abgewogen werden. So können die *in vitro* beobachteten strukturellen Veränderungen der Zellen, *in vivo* in Form von Granulomata zu erheblichen Beeinträchtigungen, z.B. in der Lunge (Chou et al., 2008; Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004) oder im subkutanen Gewebe (Koyama et al., 2006) führen. Ebenso konnten einige Studien einen Zusammenhang einer erhöhten Expression von FAK mit einer Krebsentstehung herstellen (Aronsohn et al., 2003; Kahana et al., 2002; Owens et al., 1995; Tremblay et al., 1996).

## **5.8 Mechanismen der Kohlenstoff Nanoröhren –induzierten zellulären Antwort: eine Arbeitshypothese und Ausblick**

Die hier gezeigten Experimente in humanen Lungenepithel Zellen (A549) und Endothel-ähnlichen Zellen (ECV304) belegen, dass *Carbon Nanotubes* nach intrazellulärer Aufnahme zwar keinen akut cytotoxischen Einfluss ausüben, jedoch mit standardisierten Testsystemen interagieren und zu falschen Ergebnissen führen können. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Kohlenstoff Nanoröhren in Abhängigkeit ihres Gehalts an Verunreinigung, wie z.B. Metalle und amorpher Kohlenstoff, zeit- und dosisabhängig in Zellen, und auch im zellfreien System ROS-induzieren, dass jedoch nach Aufreinigung oder Oberflächenmodifizierung diese Effekte beeinflusst werden können. Dieser durch CNT-Verunreinigungen induzierte

Oxidative Stress scheint eine große Rolle in der Beeinflussung inflammatorischer Effekte zu spielen. So konnte eine Aktivierung des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NFκB in Abhängigkeit von der Fähigkeit der Partikel intrazelluläre ROS zu induzieren, gezeigt werden. NFκB-Aktivierung war jedoch ebenfalls in den Zellen zu beobachten, die mit den aufgereinigten SWCNT a.t. behandelt wurden. Dies lässt vermuten, dass *Carbon Nanotubes* zumindest teilweise ROS-unabhängige zelluläre Effekte hervorrufen können. Die genauen Mechanismen der ROS-unabhängigen Effekte, müssen zu diesem Zeitpunkt noch offen bleiben und weiterhin geklärt werden. Eine Aktivierung und Stimulation über einen TLR4- und MyD88-abhängigen Signalweg konnte in diesem Zusammenhang jedoch ausgeschlossen werden. Des Weiteren kam es nach 24h zu einer signifikanten Veränderung des Zellverhaltens in Form von CNT-Zell-Agglomeraten, die eine erhöhte „*Focal Adhesion*“-Formation sowie Stressfasern in Zellen aufwiesen, die in direktem Kontakt mit den CNT-Bündeln lagen. Auch auf Proteinebene konnte hierbei gezeigt werden, dass die „*Focal Adhesion*“ Signalkaskade nach SWCNT a.t. Kontakt aktiviert wird, indem es zu einer zeitabhängigen Aktivierung von FAK und von Vinculin kommt. Abbildung 5.1 zeigt schematisch die zellulären Mechanismen und Reaktionen, die nach Inkubation von A549 und ECV304 Zellen mit Kohlenstoff Nanoröhren festgestellt werden konnten.

Die Frage, ob überhaupt und wenn ja, inwieweit Kohlenstoff Nanoröhren gesundheitliche Effekte hervorrufen, bleibt weiterhin stark umstritten. Eine genaue Analyse wird dadurch erschwert, dass verschiedene Faktoren, wie z.B. der hier beschriebene Einfluss von Verunreinigungen auf CNT-induzierten Oxidativen Stress, außerdem die CNT-Länge (Donaldson et al., 2006; Helland et al., 2007; Ito et al., 2007; Li et al., 2007; Sato, 2005), Oberfläche und katalytische Reaktivität, das Aggregationsverhalten (Raja et al., 2007; Wick et al., 2007) und Modifikationen verschiedene, auch synergistische Wirkungen auf biologische Reaktionen hervorrufen können. Des Weiteren spielt auch die Methode der Partikelverabreichung sowie das Trägermaterial, in dem die CNTs gelöst sind, eine große Rolle (Mitchell et al., 2007; Osier and Oberdörster, 1997). Mitchell et al. (2007) konnten z.B. zeigen, dass im Gegensatz zu den bisher berichteten pathologischen Veränderungen der Lunge nach CNT-Instillation und Aspiration, die Inhalation von MWCNTs zu keinen signifikanten Gewebeschäden führt.

Es ist außerordentlich wichtig, das Verhalten von Nanopartikeln auf dem molekularen und zellulären Level zu charakterisieren. Realitätsnahe Modell-Systeme müssen entwickelt werden, um ein besseres Verständnis dafür zu bekommen, wie Nanopartikel auf das

Gesamtsystem der Zellkommunikation und Organisation einwirken. Molekulare, zelluläre und patho-physiologische Endpunkte sollen letztlich Richtlinien für ökologische Konsequenzen liefern. Somit ist es von größter Bedeutung, standardisierte Bedingungen zu schaffen und eine wissenschaftlich fundierte Datenbasis zur Bewertung möglicher Risiken zu erarbeiten. Hierzu gehören Gefährdungsbeurteilung entsprechender Arbeitsplätze und Vorsorgemaßnahmen, um eine mögliche Exposition zu vermeiden, ebenso wie gezielte experimentelle Untersuchungen, die ein expositionsrelevantes Risikomanagement erlauben (Donaldson et al., 2006; Helland et al., 2007).

Denn trotz der zunehmenden Bedenken der gesundheitlichen Auswirkungen von Nanopartikeln gibt es noch kaum Informationen und Konzentrationsangaben einer Exposition, z.B. während der Herstellung, Verarbeitung oder Anwendung. Es ist deshalb notwendig, Technologien und Messverfahren für mögliche Expositionsmuster zu erstellen, um die vielfältigen Verbreitungsmöglichkeiten und die möglichen gesundheitlichen Effekte zu charakterisieren und abzuschätzen.

*In vitro* Studien können jedoch die Effekte der Interaktion von Nanopartikeln mit der Lunge und dem Organismus nicht ausreichend darstellen. In der Zellkultur wird nur ein Ausschnitt der möglichen Gesamtreaktion gezeigt, der zwar erste, reproduzierbare Hinweise liefern kann, der jedoch nicht ausreichend für eine komplette Analyse der gesundheitlichen Auswirkungen von Nanopartikeln auf den Menschen ist. Aber auch die gängigen Tiermodelle wie Maus und Ratte für *in vivo* inhalationstoxikologische Untersuchungen unterscheiden sich noch zu sehr vom Menschen und liefern somit ebenfalls nur Hinweise.

Dennoch können die in dieser Arbeit gezeigten Daten erste Aufschlüsse der zu erwartenden Toxizität und des Verhaltens von CNTs in biologischen Systemen liefern und Einblicke insbesondere in die mechanistischen Vorgänge nach CNT-Kontakt geben.

Bisherige *in vivo* Studien mit CNTs konnten die durchgeführten Zellkulturversuche weitestgehend bestätigen. So wurde in bisherigen Expositionsstudien ebenso eine fehlende akute Cytotoxizität (Templeton et al., 2006), Oxidativer Stress (Chou et al., 2008; Li et al., 2007; Oberdörster, 2004) und inflammatorische Entzündungsmechanismen (Chou et al., 2008; Grubek-Jaworska et al., 2006; Shvedova et al., 2007) festgestellt. Auch die beschriebenen strukturellen Veränderungen der Zellen nach CNT-Kontakt können *in vivo* gefunden werden (Mangum et al., 2006) und könnten die Bildung von Granulomata im

Lungengewebe nach CNT-Instillation erklären (Chou et al., 2008; Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004).

Zu wenig ist im Moment noch über realistische Expositions-Werte von *Carbon Nanotubes* bekannt. Einerseits erlaubt ihre aerodynamische Form eine Deposition bis hin zu den Alveolen der Lunge, andererseits führt ihr stark ausgeprägtes Agglomerationsverhalten zu einer verminderten Aerosolbildungsfähigkeit und zu Agglomeraten im Mikrometerbereich. Die bestehenden Expositionsmodelle für UFP scheinen hier ungeeignet, da Nanopartikel sich in ihrem Verhalten unterscheiden (Duffin et al., 2007; Kümpel et al., 2006). Konventionelle Expositions-Studien beruhen typischerweise auf der Charakterisierung der Massenkonzentration und der chemischen Beschaffenheit von grobkörnigem Material, zwei Parameter, die bei der Verwendung von Nanopartikeln ungeeignet sind. Besser wäre es, die Partikelanzahl-Konzentration, oder alternativ die Größenverteilung als Parameter zu wählen, um damit Rückschlüsse auf die Oberfläche, physiko-chemischen Eigenschaften, Masse und Anzahlkonzentration zu erhalten (Maynard et al., 2007; Tsuji et al., 2006).

Erste Messungen einer arbeitsplatzbezogenen Exposition mit CNTs ergab eine relativ geringe Konzentration von ungefähr  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , welche hauptsächlich in Form von Aggregaten gefunden wurde (Maynard et al., 2004). Dennoch können auch sehr kleine Mengen von Nanomaterialien eine große Partikelanzahl enthalten, wie aus Studien mit Ultrafeinpartikeln bekannt ist (Hughes et al., 1998). Es bedarf daher einer verstärkten Untersuchung und Charakterisierung von CNT-Aerosolen und die Erforschung chronischer Inhalationsexperimente *in vivo*, um ein vollständigeres Bild für die Risiko-Analyse von Kohlenstoff Nanotubes zu erhalten.

Unter den Publikationen sind verschiedene Arbeiten, die unabhängig voneinander über die Bildung von entzündlichen Veränderungen des Lungengewebes berichten, nachdem sowohl SWCNTs als auch MWCNTs in Lungen von Ratten, Mäusen bzw. Meerschweinchen instilliert wurden. Diese Entzündungen können zu eingeschränkten Lungenfunktionen und letztlich zu Lungenfibrosen führen (Grubek-Jaworska et al., 2006; Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004). Hierbei ist allerdings unklar, ob die beobachteten entzündlichen Reaktionen aufgrund der Inkubation mit SWCNTs entstanden sind, bzw. ob zu hohe Dosierungen verwendet wurden, da 15% der Tiere durch Ersticken aufgrund einer durch Agglomeration hervorgerufenen Blockade der Luftwege starben. Ein weiterer

Grund für die aufgetretene Toxizität könnte auch das Vorhandensein von Verunreinigungen wie Graphit oder Übergangsmetallen sein, z.B. Eisen oder Nickel, die mit den Partikeln assoziiert waren. Mangum et al. (2006) diskutieren die Möglichkeit, als Biomarker auftretende strukturelle Veränderungen im Lungengewebe nach Exposition mit CNTs anzuwenden.

Für die Untersuchung einer möglichst realitätsnahen Exposition dürfen nicht nur lokale Reaktionen, sondern müssen auch alle weiteren Zellsysteme, die mit Kohlenstoff Nanoröhren in Kontakt kommen, wie z.B. das Immunsystem, berücksichtigt werden und das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren im Organismus auf systemische und synergistische Effekte hin untersucht werden. Für PM<sub>2,5</sub> sind z.B. systemische kardiovaskuläre Effekte beschrieben (Nemmar et al., 2004). Auch die Lungeninstillation von Mäusen mit Säure-behandelten SWCNTs führte im Herzmuskelgewebe zu Oxidativem Stress mit mitochondrialer Dysfunktion (Li et al., 2007). Des Weiteren wurde eine veränderte Funktionen des Immunsystems nach MWCNT-Inhalation bei Mäusen festgestellt (Mitchell et al., 2007). Synergistische Effekte und Interaktionen von UFP, wie z.B. *Carbon Black* auf bestehende Lungeninfektionen sowie von Partikeln untereinander sind mehrfach beschrieben (Chalupa et al., 2004; Hammond et al., 1979; Lambert et al., 2003; Mossman and Churg, 1998). Ähnliche Effekte konnten nach SWCNT-Aspiration in Mäusen festgestellt werden. Vitamin E-Mangel führte zu einer verstärkten CNT-induzierten inflammatorischen Antwort und Oxidativem Stress (Shvedova et al., 2007). Dies zeigt eine verstärkte Sensitivität für CNT-Toxizität bei gleichzeitigem Mangel an Antioxidanzien.

Bevor inhalierte Partikel mit Lungenzellen in Kontakt treten, treffen sie auf das pulmonare *Surfactant*, welches aus einem komplexen Gemisch von Lipiden, Phospholipiden und Proteinen besteht und notwendig für die Lungenfunktion ist. Die unspezifische Adsorption von Proteinen an *Carbon Nanotubes* ist bekannt und mehrfach beschrieben (Somasundaran et al., 2004). Dabei wurde vermutet, dass die Adsorption von Surfactantproteinen die primäre Toxizität von CNTs abschwächen könnte (Davoren et al., 2007; Dutta et al., 2007; Okeson et al., 2004) oder, dass CNTs notwendige Bestandteile des *Surfactants* abfangen werden, was zu einer indirekten Toxizität führen kann (Raja et al., 2007). Faucaud et al. (2007) untersuchen die Auswirkungen von DPPC („*dipalmitoyl phosphatidyl choline*“), einem Bestandteil des Lungen-*Surfactant* sowie BSA, auf das oxidative Potential von *Carbon Black* (CB14). Mithilfe des DCF-Tests konnten sie zeigen, dass die jeweiligen Zusätze eine Erhöhung der ROS-Freisetzung sowohl im zellfreien

System als auch nach Exposition von Makrophagen zur Folge hatten. Salvador-Morales et al. (2007) konnten ebenfalls eine selektive Anlagerung von Bestandteilen des Lungen-*Surfactants* an SWCNTs nachweisen. Eine chronische Lungenexposition mit CNTs könnte demnach zu einer erhöhten Anfälligkeit der Lunge gegenüber Pathogenen führen.

Der Lebenszyklus von Kohlenstoff Nanoröhren schließt aber nicht nur die Produktion und Verarbeitung ein, bei der es zu einer Aerosolbildung kommen kann, sondern auch die Entsorgung, die ein wichtiger Bestandteil der Expositions-relevanten Untersuchung ist. Auf lange Sicht wird sich die Verteilung und Anreicherung von industriellen Nanopartikeln in Ökosystemen, wie Boden und Grundwasser weiter erhöhen, wobei sich die CNTs in einer noch nicht vorhersehbaren Weise verändern und degradieren könnten (Hyung et al., 2007; Roberts et al., 2007). Die CNT-Oberfläche scheint für die Adsorption von organischem Material, insbesondere aromatischen Nitroverbindungen, hierbei besonders attraktiv zu sein und auf starken Elektronenwechselwirkungen der Komponenten zu beruhen (Chen et al., 2007).

Mit steigender Exposition würde sich damit die Konzentration dieser unnatürlichen Partikel direkt proportional zu ihrem Nutzen in der Gesellschaft erhöhen. Aus diesem Grund ist es notwendig, neben Inhalationsstudien auch Expositionsstudien von ökotoxikologisch-relevanten Organismen durchzuführen. Untersuchungen von Invertebraten und Vertebraten mit in Wasser gelösten C60 Fullerenen konnten signifikante sub-lethale Effekte, wie z.B. verminderte Reproduktionsfähigkeit in Daphnien hervorrufen. In Fischen war allerdings keine der P450 Isoenzyme, als Marker der Wirkung von lipophilen Xenobiotika, in ihrer Expression verändert (Oberdörster et al., 2006). Ebenfalls im Fischsystem wurde über Anzeichen von Oxidativem Stress und Osmoregulatorischen- und Reproduktionsstörungen sowie pathologischen Effekten nach Fulleren- sowie SWCNT-Kontakt berichtet (Cheng et al., 2007; Oberdörster, 2004; Smith et al., 2007). Exposition von Ruderfußkrebse (*Copepoda*) mit im Wasser gelösten, gereinigten SWCNTs ergab keine erhöhte Mortalität, Entwicklungs- oder Reproduktionsstörungen. Templeton et al. (2006) schließen daraus, dass es bei Exposition umweltrelevanter Konzentrationen von Kohlenstoff Nanoröhren zu keinen signifikanten Effekten bei den im Wasser lebenden Krebsen kommt.

Für eine realistische Abschätzung von Exposition, Gefährdung und dem einhergehenden Risiko reicht die derzeitige Datenlage allerdings nicht aus. Aus diesem Grund sind regulatorische Maßnahmen nur schwer durchzusetzen (Oberdörster et al., 2005).

Eine erste Risiko-Analyse für die industrielle Synthese verschiedener Nanopartikel, darunter auch SWCNTs, untersuchte das relative Risiko bezogen auf die Flüchtigkeit, Kanzerogenität, Entflammbarkeit, Toxizität und Persistenz der Partikel. Die Studie ergab, dass das Umweltrisiko basierend auf den verwendeten Daten, verglichen mit anderen derzeit verwendeten Industrie-Verfahren, relativ gering ist (Robichaud et al., 2005).

Obwohl gesicherte Daten über mögliche gesundheitliche Risiken und die toxikologischen Mechanismen der Nanopartikel noch sehr spärlich vorhanden sind, gibt es besonders auf dem Gebiet der Medizin und Medikamentenentwicklung Anzeichen, dass Nanopartikel zum Beispiel als Medikamententräger eingesetzt werden können, um effizienter und gezielter wirken zu können (Kreuter et al., 2002). Nanopartikel könnten als Trojanische Pferde genutzt werden, um Material in die Zelle einzuschleusen, welches ansonsten nicht die Membran durchqueren kann (Limbach et al., 2007).

Bevor dieses Ziel Realität werden kann, müssen die intrazellulären Auswirkungen von Nanoteilchen jedoch noch gründlicher untersucht, charakterisiert und die möglichen Risiken abgewogen werden.

Bisherige *in vitro* Studien mit Kohlenstoff Nanoröhren konzentrierten sich hauptsächlich auf toxikologisch relevante Endpunkte und deren zugrunde liegenden Mechanismen. Auf dem Gebiet der Medikamentenentwicklung ist es jedoch notwendig, dass Nanopartikel gezielt in bestimmte Zellen oder sogar Organellen eingeschleust werden. Vielversprechend ist die Entdeckung, dass einsträngige DNA-Moleküle mit CNTs Hybride formen können (Zheng et al., 2003). Funktionalisierte CNTs könnten so als Gen-basierte zelluläre Transporter für eine potentielle Gentherapie eingesetzt werden (Singh et al., 2005). Die Frage einer möglichen Genotoxizität von Kohlenstoff Nanoröhren ist bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch noch weitestgehend unbeantwortet. In dieser Arbeit konnten allerdings keine CNTs im Zellkern gefunden werden und das bestätigt damit Literaturhinweise, dass eine direkte Interaktion von CNTs mit der nucleären DNA unwahrscheinlich ist. Dieses Ergebnis konnte mithilfe des alkalischen Comet Assays, der DNA-Strangbrüche aufdeckt, experimentell abgesichert werden (Singh et al., 1988). Eine 24h Inkubation führte in A549 Zellen mit keinen der in dieser Arbeit verwendeten *Carbon Nanotubes* zu einer signifikanten Zunahme von Doppel- oder Einzelstrangbrüchen

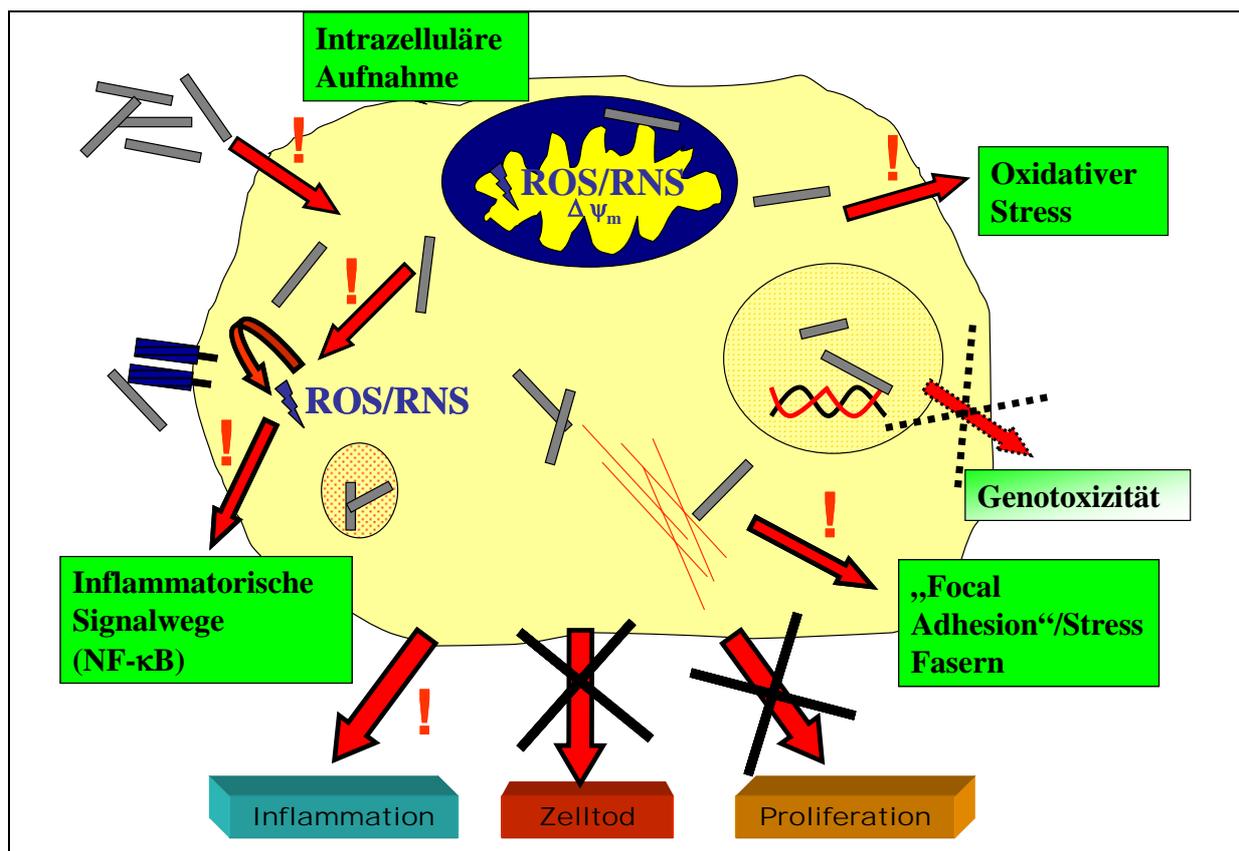
(Özdemir, 2007). Allerdings, auch wenn es zu keinem direkten Kontakt von CNTs mit der DNA kommt, kann es durch eine indirekte Genotoxizität ebenfalls zu DNA-Schäden kommen. Dazu gehören Oxidativer Stress und ROS, die in den Kern diffundieren und zu DNA-Schäden, mit Doppel-, Einzelstrangbrüchen oder oxidierten Basen führen können. Die Purinmodifikation, die dabei am häufigsten auftritt, ist 8-Hydroxyguanin. Für einige Partikel, wie z.B. Asbest, ist eine Mutagenität und Kanzerogenität aufgrund von Oxidativem Stress beschrieben (Xu et al., 2002). Neueste Ergebnisse berichten, dass sowohl unveränderte als auch aufgereinigte MWCNTs genotoxische Effekte in embryonalen Mausstammzellen auslösen (Zhu et al., 2007). Zum einen konnten nach CNT-Behandlung ROS-induzierte DNA-Schäden festgestellt werden und zum anderen wurde eine zweifache Erhöhung der Mutationshäufigkeit in den behandelten Zellen sowie eine Aktivierung von p53 festgestellt. Kirsin et al. (2007) konnten in ihrer Studie mit Säure-behandelten SWCNT keine Erhöhung der Mutationshäufigkeit feststellen. Allerdings zeigen sie eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung von Strangbrüchen in Fibroblasten, jedoch ohne signifikante Induktion von Mikronuclei.

Die hier dargestellten *in vitro* Studien haben gezeigt, dass CNTs keine akut-cytotoxischen Einflüsse auf humane Zellen ausüben. Es sollten aber dennoch keine voreiligen Schlüsse aus Einzelergebnissen gezogen werden, die nicht durch verschiedene Testsysteme wiederholt und bestätigt wurden. Alternative Methoden zur Toxizitätsbewertung von Kohlenstoff Nanomaterialien, z.B. den „*colony formation assay*“ (Puck and Marcus, 1956) sollten in Betracht gezogen werden, welche die Verwendung von Farbstoffen und Fluoreszenzmessungen vermeiden, die mit den CNTs interagieren können (Herzog et al., 2007). Außerdem konnte mit dieser Arbeit die bedeutende Rolle der CNT-Verunreinigungen bei der CNT-induzierten Toxizität herausgearbeitet und in Verbindung mit inflammatorischen Effekten gebracht werden. Allerdings gibt es Hinweise, dass diese neuartigen Nanopartikel auch zelluläre Reaktionen hervorrufen können, die es bisher in dieser Form noch nicht gab. Aus diesem Grund erfordert der Umgang mit Nanomaterialien stets erhöhte Aufmerksamkeit, da einzigartige Eigenschaften der neuen Materialien nicht nur im technischen Bereich sondern auch bei den biologischen Wirkungen gezeigt werden konnten.

Dennoch darf die Angst vor einer möglichen Toxizität den Fortschritt der Nanotechnologie nicht überschatten. Vielmehr müssen aufgrund der Datenlage die Risiken und Gefahren abgewogen und dem potentiellen Nutzen gegenübergestellt werden.

In der Diskussion über die Nanotoxikologie muss sich ebenfalls die Frage gestellt werden, ob der Mensch und die Ökosysteme einer Exposition mit industriellen Nanopartikeln aufgrund der Tatsache natürlich vorkommender Fullerene in der Umwelt (Fang and Wong, 1997; Utsunomiya et al., 2002) sowie Kohlenstoff Nanoröhren, die schon in einem 10.000 Jahre alten Schmelzwasser von Eis-Kern Proben gefunden wurden (Murr et al., 2004), nicht vielleicht doch besser gewappnet sind als man bisher angenommen hat.

Die vorliegenden Ergebnisse sind richtungweisend in Bezug auf die Charakterisierung einer potentiellen Toxizität und Biokompatibilität von Kohlenstoff Nanoröhren *in vitro* und den zugrunde liegenden Mechanismen, lassen aber auch Raum für Spekulationen offen. Angesichts der vielen, noch immer unbeantworteten Fragen muss die weitere Erforschung der Nanopartikel mit gut charakterisierten Partikeln, standardisierten Testsystemen und Expositions-relevanten Studien oberste Priorität haben!



**Abb. 5.1:** Schematische Darstellung der aktuellen Arbeitshypothese von *Carbon Nanotube*-induzierten zellulären Mechanismen in humanen Lungenzellen

Die intrazelluläre Aufnahme von Kohlenstoff Nanoröhren führt im zellulären *in vitro* System zu keinem Verlust der Zellvitalität oder einer negativen Beeinflussung der Proliferation. CNTs induzieren jedoch pro-inflammatorische Effekte durch die Freisetzung von ROS und nachfolgender Aktivierung inflammatorischer Signalwege. Eine potentielle Genotoxizität konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Allerdings führt der Kontakt der Zellen mit CNTs zu einer aktiven Umstrukturierung der Zellmorphologie mit vermehrter Bildung von Stress Fasern und „*Focal Adhesions*“.

## 6 Literatur

Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* 67, 359-367 (1971).

Adelmann, P., Baierl, T., Drosselmeyer, E., Politis, C., Polzer, G., Seidel, A., Schwegler-Berry, D., and Steinleitner, C. Effects of fullerenes on alveolar macrophages in vitro. In: Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract (Eds. Mohr, U. , Dungworth, D. L. , Maulderly, J. , and Oberdörster, G. ), ILSI Press, Washington DC (1994).

Ahsan, H., Ali, A., and Ali, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 398-404 (2003).

Ajayan, P.M. Nanotechnology: how does a nanofibre grow? *Nature* 427, 402-403 (2004).

Ajayan, P.M. Nanotubes from Carbon. *Chem. Rev.* 99, 1787-1800 (1999).

Ajayan, P.M., Charlier, J., and Rinzler, A.G. Carbon nanotubes: from macromolecules to nanotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14199-14200 (1999).

Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., and Miyake, K. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 164, 3471-3475 (2000).

Allen, M., Myer, B., and Rushton, N. In vitro and in vivo investigations into the biocompatibility of diamond-like carbon (DLC) coatings for orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res.* 58, 319-328 (2001).

Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275, 1308-1311 (1997).

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249 (1996).

Aoki, N., Akasaka, T., Watari, F., and Yokoyama, A. Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions. *Dental Materials Journal* 26, 178-185 (2006).

Aronsohn, M.S., Brown, H.M., Hauptman, G., and Kornberg, L.J. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 113, 1944-1948 (2003).

Asuri, P., Karajanagi, S.S., Yang, H., Yim, T.J., Kane, R.S., and Dordick, J.S. Increasing protein stability through control of the nanoscale environment. *Langmuir* 22, 5833-5836 (2006).

Baggs, R.B., Ferin, J., and Oberdörster, G. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet. Pathol.* 34, 592-597 (1997).

- Balaban, T.S., Balaban, M.C., Malik, S., Hennrich, F., Fischer, R., Rösner, H., and Kappes, M.M. Friedel-Crafts Polyacetylation of single-walled carbon nanotubes: An efficient method for functionalizing, purifying, decorating, and linking carbon allotropes. *Adv. Mater.* 18, 2763-2767 (2006).
- Balani, K., Anderson, R., Laha, T., Andara, M., Tercero, J., Crumpler, E., and Agarwal, A. Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 28, 618-624 (2007).
- Baldwin, A.S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-683 (1996).
- Becker, S., Dailey, L., Soukup, J.M., Silbajoris, R., and Devlin, R.B. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 45-52 (2005).
- Becker, S., Mundandhara, S., Devlin, R.B., and Madden, M. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: Further mechanistic studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 269-275 (2005).
- Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A., and Wick, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon* 45, 2648 (2007).
- Bianco, A., Kostarelos, K., and Prato, M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 674-679 (2005).
- Bianco, A., Kostarelos, K., Partidos, C.D., and Prato, M. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chem. Commun. (Camb.)*, 571-577 (2005).
- Bonini, M.G., Rota, C., Tomasi, A., and Mason, R.P. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic. Biol. Med.* 40, 968-975 (2006).
- Borm, P.J. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. *Inhal. Toxicol.* 14, 311-324 (2002).
- Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A., and Mustelin, T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol. Lett.* 160, 121-126 (2006).
- Boyd, J.T., Doll, R., Faulds, J.S., and Leiper, J. Cancer of the lung in iron ore (haematite) miners. *Br. J. Ind. Med.* 27, 97-105 (1970).
- Brown, D.M., Donaldson, K., and Stone, V. Effects of PM10 in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir. Res.* 5, 29 (2004).
- Brown, D.M., Donaldson, K., Borm, P.J., Schins, R.P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L.A., and Stone, V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 286, L344-L353 (2004).

Brown, D.M., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W., and Donaldson, K. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup. Med.* 57, 685-691 (2000).

Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175, 191-199 (2001).

Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jakoubkova, J., Sainerova, H., and Donner, J. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int. J. Cancer* 11, 765-773 (1973).

Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 487-525 (1988).

Campbell, J.H. and Campbell, G.R. Endothelial cell influences on vascular smooth muscle phenotype. *Annu. Rev. Physiol* 48, 295-306 (1986).

Casey, A., Davoren, M., Herzog, E., Lyng, F.M., Byrne, H.J., and Chambers, G. Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. *Carbon* 45, 34-40 (2007).

Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F.M., Byrne, H.J., and Chambers, G. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 45, 1425-1432 (2007).

Castranova, V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 916-925 (2004).

Castranova, V., Ma, J.Y., Yang, H.M., Antonini, J.M., Butterworth, L., Barger, M.W., Roberts, J., and Ma, J.K. Effect of exposure to diesel exhaust particles on the susceptibility of the lung to infection. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl 4, 609-612 (2001).

Chakrabarti, R., Kundu, S., Kumar, S., and Chakrabarti, R. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *J. Cell Biochem.* 80, 133-138 (2000).

Chalupa, D.C., Morrow, P.E., Oberdörster, G., Utell, M.J., and Frampton, M.W. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ. Health. Perspect.* 112, 879-882 (2004).

Chan, E.L. and Murphy, J.T. Reactive oxygen species mediate endotoxin-induced human dermal endothelial NF-kappaB activation. *J. Surg. Res* 111, 120-126 (2003).

Chen, B.C., Yu, C.C., Lei, H.C., Chang, M.S., Hsu, M.J., Huang, C.L., Chen, M.C., Sheu, J.R., Chen, T.F., Chen, T.L., Inoue, H., and Lin, C.H. Bradykinin B2 receptor mediates NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression via the Ras/Raf-1/ERK pathway in human airway epithelial cells. *J. Immunol.* 173, 5219-5228 (2004).

- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425-1428 (1997).
- Chen, F. and Shi, X. Signaling from toxic metals to NF-kappaB and beyond: not just a matter of reactive oxygen species. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 5, 807-811 (2002).
- Chen, F., Castranova, V., and Shi, X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am. J. Pathol.* 159, 387-397 (2001).
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., and Demers, L.M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* 45, 7-17 (1999).
- Chen, F., Ding, M., Castranova, V., and Shi, X. Carcinogenic metals and NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biochem.* 222, 159-171 (2001).
- Chen, J., Hamon, M.A., Hu, H., Chen, Y., Rao, A.M., Eklund, P.C., and Haddon, R.C. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science* 282, 95-98 (1998).
- Chen, Q., Saitel, C., Manickavasagam, S., Schadler, L.S., Siegel, R.W., and Yang, H. Aggregation behavior of single-walled carbon nanotubes in dilute aqueous suspension. *J. Colloid Interface Sci.* 280, 91-97 (2004).
- Chen, R.J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis, K.A., Kam, N.W., Shim, M., Li, Y., Kim, W., Utz, P.J., and Dai, H. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 4984-4989 (2003).
- Chen, W., Duan, L., and Zhu, D. Adsorption of polar and nonpolar organic chemicals to carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8295-8300 (2007).
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B., and Wan, L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol. Lett.* 163, 109-120 (2006).
- Cheng, J., Flahaut, E., and Cheng, S.H. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 708-716 (2007).
- Cherukuri, P., Bachilo, S.M., Litovsky, S.H., and Weisman, R.B. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15638-15639 (2004).
- Cherukuri, P., Gannon, C.J., Leeuw, T.K., Schmidt, H.K., Smalley, R.E., Curley, S.A., and Weisman, R.B. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 18882-18886 (2006).
- Cheung, C.L., Hafner, J.H., and Lieber, C.M. Carbon nanotube atomic force microscopy tips: direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3809-3813 (2000).
- Chlopek, J., Czajkowska, B., Szaraniec, B., Frackowiak, E., Szostak, K., and Beguin, F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* 44, 1106-1111 (2006).

- Cho, H.Y., Jedlicka, A.E., Clarke, R., and Kleeberger, S.R. Role of Toll-like receptor-4 in genetic susceptibility to lung injury induced by residual oil fly ash. *Physiol. Genomics* 22, 108-117 (2005).
- Chou, C.C., Hsiao, H.Y., Hong, Q.S., Chen, C.H., Peng, Y.W., Chen, H.W., and Yang, P.C. Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano. Lett.* 8, 437-445 (2008).
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J., and Gusovsky, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274, 10689-10692 (1999).
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133, 1403-1415 (1996).
- Chung, S.W., Chung, H.Y., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N., Kizu, R., and Hayakawa, K. An environmental quinoid polycyclic aromatic hydrocarbon, acenaphthenequinone, modulates cyclooxygenase-2 expression through reactive oxygen species generation and nuclear factor kappa B activation in A549 cells. *Toxicol. Sci.* 95, 348-355 (2007).
- Churg, A., Xie, C., Wang, X., Vincent, R., and Wang, R.D. Air pollution particles activate NF-kappaB on contact with airway epithelial cell surfaces. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 37-45 (2005).
- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M., and Hynes, R.O. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J. Cell Biol.* 142, 573-586 (1998).
- Collins, P.G. and Avouris, P. Nanotubes for electronics. *Sci. Am.* 283, 62-69 (2000).
- Colvin, V.L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.* 21, 1166-1170 (2003).
- Cui, D., Tian, F., Ozkan, C.S., Wang, M., and Gao, H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 155, 73-85 (2005).
- Cukierman, E., Pankov, R., and Yamada, K.M. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 633-639 (2002).
- Curtis, A.S. and Wilkinson, C.D. Reactions of cells to topography. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed* 9, 1313-1329 (1998).
- Dalby, M.J., Di, S.L., Davies, G.W., and Bonfield, W. Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 11, 805-810 (2000).
- Dalton, A.B., Collins, S., Munoz, E., Razal, J.M., Ebron, V.H., Ferraris, J.P., Coleman, J.N., Kim, B.G., and Baughman, R.H. Super-tough carbon-nanotube fibres. *Nature* 423, 703 (2003).
- Dauphinee, S.M. and Karsan, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest.* 86, 9-22 (2006).

Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H.J., and Lyng, F.M. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 438-448 (2007).

Diabaté, S., Mühlhopt, S., Paur, H.R., and Krug, H.F. Pro-inflammatory effects in lung cells after exposure to fly ash aerosol via the atmosphere or the liquid phase. *Ann. occup. Hyg.* 46, 382-385 (2002).

Diabaté, S., Mühlhopt, S., Paur, H.R., Wottrich, R., and Krug, H.F. In vitro effects of incinerator fly ash on pulmonary macrophages and epithelial cells. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204, 326 (2002).

Dick, C.A., Brown, D.M., Donaldson, K., and Stone, V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal. Toxicol.* 15, 39-52 (2003).

Ding, L., Stilwell, J., Zhang, T., Elboudwarej, O., Jiang, H., Selegue, J.P., Cooke, P.A., Gray, J.W., and Chen, F.F. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano. Lett.* 5, 2448-2464 (2005).

Dirks, W.G., MacLeod, R.A., and Drexler, H.G. ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross- contamination at source. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 35, 558-559 (1999).

Dockery, D.W., Luttmann-Gibson, H., Rich, D.Q., Link, M.S., Schwartz, J.D., Gold, D.R., Koutrakis, P., Verrier, R.L., and Mittleman, M.A. Particulate air pollution and nonfatal cardiac events. Part II. Association of air pollution with confirmed arrhythmias recorded by implanted defibrillators. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 124, 83-126 (2005).

Donaldson, K. and Stone, V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann. Ist. Super. Sanita* 39, 405-410 (2003).

Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., and Alexander, A. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol. Sci.* 92, 5-22 (2006).

Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., and MacNee, W. Ultrafine particles. *Occup. Environ. Med.* 58, 211-6, 199 (2001).

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W., and Borm, P.J. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* 61, 727-728 (2004).

Dreher, K.L. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 77, 3-5 (2004).

Drexler, H.G., Quentmeier, H., Dirks, W.G., and MacLeod, R.A. Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38, 185-186 (2002).

Driscoll, K.E., Carter, J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.G., Pepelko, W., Baggs, R.B., and Oberdörster, G. Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in

- rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 372-380 (1996).
- Duffin, R., Mills, N.L., and Donaldson, K. Nanoparticles-a thoracic toxicology perspective. *Yonsei Med. J.* 48, 561-572 (2007).
- Dumonteil, S., Demortier, A., Detriche, S., Raes, C., Fonseca, A., Ruhle, M., and Nagy, J.B. Dispersion of carbon nanotubes using organic solvents. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 1315-1318 (2006).
- Dumortier, H., Lacotte, S., Pastorin, G., Marega, R., Wu, W., Bonifazi, D., Briand, J.P., Prato, M., Muller, S., and Bianco, A. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano. Lett.* 6, 1522-1528 (2006).
- Dutta, D., Sundaram, S.K., Teeguarden, J.G., Riley, B.J., Fifield, L.S., Jacobs, J.M., Addleman, S.R., Kaysen, G.A., Moudgil, B.M., and Weber, T.J. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol. Sci.* 100, 303-315 (2007).
- Dye, J.A., Adler, K.B., Richards, J.H., and Dreher, K.L. Role of soluble metals in oil fly ash-induced airway epithelial injury and cytokine gene expression. *Am. J. Physiol* 277, L498-L510 (1999).
- Eiserich, J.P., Patel, R.P., and O'Donnell, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med.* 19, 221-357 (1998).
- Evelyn, A., Mannick, S., and Sermon, P.A. Unusual carbon-based nanofibres and chains among diesel-emitted particles. *Nano. Lett.* 1, 63-64 (2003).
- Fang, P.H. and Wong, R. Evidence for fullerene in a coal of Yunnan, Southwestern China. *Mat. Res. Innovat.* 1, 130-132 (1997).
- Faure, E., Equils, O., Sieling, P.A., Thomas, L., Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Polentarutti, N., Muzio, M., and Arditi, M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 11058-11063 (2000).
- Fenoglio, I., Tomatis, M., Lison, D., Muller, J., Fonseca, A., Nagy, J.B., and Fubini, B. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? *Free Radic. Biol. Med* 40, 1227-1233 (2006).
- Fiorito, S., Serafino, A., Andreola, F., and Bernier, P. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon* 44, 1100-1105 (2005).
- Flahaut, E., Durrieu, M.C., Remy-Zolghardri, M., Bareille, R., and Baquey, Ch. Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon* 44, 1093-1099 (2006).
- Folkman, J. and Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345-349 (1978).

- Foucaud, L., Wilson, M.R., Brown, D.M., and Stone, V. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol. Lett.* 174, 1-9 (2007).
- Fu, K., Huang, W., Lin, Y., Zhang, D., Hanks, T.W., Rao, A.M., and Sun, Y.P. Functionalization of carbon nanotubes with bovine serum albumin in homogeneous aqueous solution. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2, 457-461 (2002).
- Fubini, B. and Hubbard, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1507-1516 (2003).
- Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J.C., Mukae, H., Suwa, T., Goto, Y., Vincent, R., and van Eeden, S.F. Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 34-41 (2002).
- Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J.C., Vincent, R., and van Eeden, S.F. Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 265-271 (2001).
- Garibaldi, S., Brunelli, C., Bavastrello, V., Ghigliotti, G., and Nicolini, C. Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. *Nanotechnology* 17, 391-397 (2006).
- Gay, N.J., Gangloff, M., and Weber, A.N. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 693-698 (2006).
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 793-805 (2001).
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im, H., V, Heyder, J., and Gehr, P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 1555-1560 (2005).
- Genova, M.L., Pich, M.M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A.I., Formiggini, G., Castelli, G.P., and Lenaz, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1011, 86-100 (2004).
- Georgakilas, V., Kordatos, K., Prato, M., Guldi, D.M., Holzinger, M., and Hirsch, A. Organic functionalization of carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 760-761 (2002).
- Gharbi, N., Pressac, M., Hadchouel, M., Szwarc, H., Wilson, S.R., and Moussa, F. [60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano. Lett.* 5, 2578-2585 (2005).
- Ghibelli, L., De, N.M., Somma, G., Cerella, C., D'Alessio, M., Romeo, E., Magrini, A., and Bergamaschi, A. [Lack of direct cytotoxic effect of intracellular nanotubes]. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 27, 383-384 (2005).

- Giannona, S., Firkowska, I., Rojas-Chapana, J., and Giersig, M. Vertically aligned carbon nanotubes as cytocompatible material for enhanced adhesion and proliferation of osteoblast-like cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1679-1683 (2007).
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423 (1973).
- Gigliotti, B., Sakizzie, B., Bethune, D.S., Shelby, R.M., and Cha, J.N. Sequence-independent helical wrapping of single-walled carbon nanotubes by long genomic DNA. *Nano. Lett.* 6, 159-164 (2006).
- Gilmour, P.S., Brown, D.M., Lindsay, T.G., Beswick, P.H., MacNee, W., and Donaldson, K. Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup. Environ. Med.* 53, 817-822 (1996).
- Gloire, G., Legrand-Pöls, S., and Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493-1505 (2006).
- Golubovskaya, V., Kaur, A., and Cance, W. Cloning and characterization of the promoter region of human focal adhesion kinase gene: nuclear factor kappa B and p53 binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 111-125 (2004).
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* 5, 1003-1011 (2000).
- Graham, A.P., Düsberg, G.S., Seidel, R.V., Liebau, M., Unger, E., Pamler, W., Kreupl, F., and Hönlein, W. Carbon nanotubes for microelectronics? *Small* 1, 382-390 (2005).
- Green, J.A. and Yamada, K.M. Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1293-1298 (2007).
- Gröning, O., Clergereaux, L., Nilsson, L.-O., Ruffieux, L., and Schlapbach, P. Carbon nanotubes for future field electron emission devices. *Proceedings of the Electrochemical Society*, 45 (2002).
- Grubek-Jaworska, H., Nejman, P., Czuminiska, K., Przybylowski, T., Huczko, A., Lange, H., Bystrzejewski, M., Baranowski, P., and Chazan, R. Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons. *Carbon* 44, 1057-1063 (2006).
- Gultekin, H. and Heermann, K.H. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* 172, 320-329 (1988).
- Gumbleton, M., Hollins, A.J., Omid, Y., Campbell, L., and Taylor, G. Targeting caveolae for vesicular drug transport. *J. Control Release* 87, 139-151 (2003).
- Hacker, H., Vabulas, R.M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., and Wagner, H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J. Exp. Med.* 192, 595-600 (2000).

- Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514 (1998).
- Halliwell, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol. Biol. (Paris)* 44, 6-13 (1996).
- Ham, H.T., Choi, Y.S., and Chung, I.J. An explanation of dispersion states of single-walled carbon nanotubes in solvents and aqueous surfactant solutions using solubility parameters. *J. Colloid Interface Sci.* 286, 216-223 (2005).
- Hammond, E.C., Selikoff, I.J., and Seidman, H. Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 330, 473-490 (1979).
- Hanks, S.K., Ryzhova, L., Shin, N.Y., and Brabek, J. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci.* 8, d982-d996 (2003).
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279 (1988).
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103 (2001).
- Helland, A., Wick, P., Koehler, A., Schmid, K., and Som, C. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 115, 1125-1131 (2007).
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3, 196-200 (2002).
- Henrich, F., Wellmann, R., Malik, S., Lebedkin, S., and Kappes, M. Reversible modification of the absorption properties of single-walled carbon nanotube thin films via nitric acid exposure. *Physical Chemistry Chemical Physics* 5, 178-183 (2003).
- Heppleston, A.G. Coal workers' pneumoconiosis: a historical perspective on its pathogenesis. *Am. J. Ind. Med.* 22, 905-923 (1992).
- Herzog, E., Casey, A., Lyng, F.M., Chambers, G., Byrne, H.J., and Davoren, M. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--the clonogenic assay. *Toxicol. Lett.* 174, 49-60 (2007).
- Higuchi, A., Sugiyama, K., Yoon, B.O., Sakurai, M., Hara, M., Sumita, M., Sugawara, S., and Shirai, T. Serum protein adsorption and platelet adhesion on pluronic-adsorbed polysulfone membranes. *Biomaterials* 24, 3235-3245 (2003).
- Hiura, T.S., Kaszubowski, M.P., Li, N., and Nel, A.E. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* 163, 5582-5591 (1999).

- Ho, Y.S., Liou, H.B., Lin, J.K., Jeng, J.H., Pan, M.H., Lin, Y.P., Guo, H.R., Ho, S.Y., Lee, C.C., and Wang, Y.J. Lipid peroxidation and cell death mechanisms in pulmonary epithelial cells induced by peroxynitrite and nitric oxide. *Arch. Toxicol.* 76, 484-493 (2002).
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162, 3749-3752 (1999).
- Hourdin, S., Longchamp, S., Gallet, O., and Nigretto, J.M. Transient amidolytic activity changes of plasmin adsorbed onto carbons. *Biomol. Eng.* 19, 281-285 (2002).
- Hughes, L.S., Cass, G.R., Gone, J., Ames, M., and Olmez, I. Physical and chemical characterization of atmospheric ultrafine particles in the Los Angeles area. *Environ. Sci. Technol.* 83, 591-599 (1998).
- Hughes, S.E. Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 225, 171-185 (1996).
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901-3903 (2006).
- Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febbraio, M., and Silverstein, S.C. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40, 195-205 (2002).
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., and Schlager, J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro* 19, 975-983 (2005).
- Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25 (1992).
- Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., and Kim, J.H. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. *Environ. Sci. Technol.* 41, 179-184 (2007).
- Ibald-Mulli, A., Wichmann, H.E., Kreyling, W., and Peters, A. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 15, 189-201 (2002).
- Iijima, S., Ajayan, P.M., and Ichihashi, T. Growth model for carbon nanotubes. *Phys. Rev. Lett.* 69, 3100-3103 (1992).
- Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Hirano, S., Ichinose, T., Shimada, A., and Yoshikawa, T. The role of toll-like receptor 4 in airway inflammation induced by diesel exhaust particles. *Arch. Toxicol.* 80, 275-279 (2006).
- Ishii, I., Tomizawa, A., Kawachi, H., Suzuki, T., Kotani, A., Koshushi, I., Itoh, H., Morisaki, N., Bujo, H., Saito, Y., Ohmori, S., and Kitada, M. Histological and functional analysis of vascular smooth muscle cells in a novel culture system with honeycomb-like structure. *Atherosclerosis* 158, 377-384 (2001).

- Isobe, H., Tanaka, T., Maeda, R., Noiri, E., Solin, N., Yudasaka, M., Iijima, S., and Nakamura, E. Preparation, purification, characterization, and cytotoxicity assessment of water-soluble, transition-metal-free carbon nanotube aggregates. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45, 6676-6680 (2006).
- Ito, Y., Venkatesan, N., Hirako, N., Sugioka, N., and Takada, K. Effect of fiber length of carbon nanotubes on the absorption of erythropoietin from rat small intestine. *Int. J. Pharm.* 337, 357-360 (2007).
- Jaffe, A.B. and Hall, A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv. Cancer Res.* 84, 57-80 (2002).
- Janssen, Y.M., Driscoll, K.E., Howard, B., Quinlan, T.R., Treadwell, M., Barchowsky, A., and Mossman, B.T. Asbestos causes translocation of p65 protein and increases NF-kappa B DNA binding activity in rat lung epithelial and pleural mesothelial cells. *Am. J. Pathol.* 151, 389-401 (1997).
- Jaspers, I., Zhang, W., Fraser, A., Samet, J.M., and Reed, W. Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and IkappaBalpha breakdown in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 769-777 (2001).
- Jensen, K., Weldon, J., Garcia, H., and Zettl, A. Nanotube Radio. *Nano. Lett.* 58, 211-6, 199 (2007).
- Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., and Guo, X. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1378-1383 (2005).
- Jiang, L., Gao, L., and Sun, J. Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes. *J. Colloid Interface Sci.* 260, 89-94 (2003).
- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Krömker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rudiger, M., Schluter, K., Stanke, G., and Winkler, J. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 379-416 (1995).
- Jordan, A., Scholz, R., Maier-Hauff, K., van Landeghem, F.K., Waldöfner, N., Teichgräber, U., Pinkernelle, J., Bruhn, H., Neumann, F., Thiesen, B., von, D.A., and Felix, R. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J. Neurooncol.* 78, 7-14 (2006).
- Jorna, T.H., Schins, R.P., Lenaerts, L., Derhaag, T.J., Wouters, E.F., and Borm, P.J. Airflow obstruction and monocyte TNF release in coal workers. *Exp. Lung Res.* 20, 421-431 (1994).
- Juliano, R.L. and Haskill, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120, 577-585 (1993).
- Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Konduru, N.V., Potapovich, A.I., Osipov, A.N., Kisin, E.R., Schwegler-Berry, D., Mercer, R., Castranova, V., and Shvedova, A.A. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicol. Lett.* 165, 88-100 (2006).

- Kahana, O., Micksche, M., Witz, I.P., and Yron, I. The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. *Oncogene* 21, 3969-3977 (2002).
- Kaida, T., Kobayashi, K., Adachi, M., and Suzuki, F. Optical characteristics of titanium oxide interference film and the film laminated with oxides and their applications for cosmetics. *J. Cosmet. Sci.* 55, 219-220 (2004).
- Kaiser, J.P., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., and Bruinink, A. Single walled carbon nanotubes (SWCNT) affect cell physiology and cell architecture. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2007).
- Kalra, A., Garde, S., and Hummer, G. Osmotic water transport through carbon nanotube membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10175-10180 (2003).
- Kaltreider, R.C., Pesce, C.A., Ihnat, M.A., Lariviere, J.P., and Hamilton, J.W. Differential effects of arsenic(III) and chromium(VI) on nuclear transcription factor binding. *Mol. Carcinog.* 25, 219-229 (1999).
- Kam, N.W. and Dai, H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6021-6026 (2005).
- Kam, N.W., Liu, Z., and Dai, H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45, 577-581 (2006).
- Kam, N.W., O'Connell, M., Wisdom, J.A., and Dai, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 11600-11605 (2005).
- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S., Kamata, K., and Hirata, H. Hydrogen peroxide activates I $\kappa$ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett.* 519, 231-237 (2002).
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621-663 (2000).
- Kashiwagi, T., Du, F., Douglas, J.F., Winey, K.I., Harris, R.H., Jr., and Shields, J.R. Nanoparticle networks reduce the flammability of polymer nanocomposites. *Nat. Mater.* 4, 928-933 (2005).
- Kendall, M., Brown, L., and Trought, K. Molecular adsorption at particle surfaces: a PM toxicity mediation mechanism. *Inhal. Toxicol.* 16 Suppl 1, 99-105 (2004).
- Kennedy, T., Ghio, A.J., Reed, W., Samet, J., Zagorski, J., Quay, J., Carter, J., Dailey, L., Hoidal, J.R., and Devlin, R.B. Copper-dependent inflammation and nuclear factor- $\kappa$ B activation by particulate air pollution. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 366-378 (1998).
- Kerfoot, S.M., Long, E.M., Hickey, M.J., Andonegui, G., Lapointe, B.M., Zanardo, R.C., Bonder, C., James, W.G., Robbins, S.M., and Kubes, P. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol.* 173, 7070-7077 (2004).

- Kim, J.K., Lee, W.K., Lee, E.J., Cho, Y.J., Lee, K.H., Kim, H.S., Chung, Y., Kim, K.A., and Lim, Y. Mechanism of silica- and titanium dioxide-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health A* 58, 437-450 (1999).
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., and Cho, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 3, 95-101 (2007).
- Kim, P. and Lieber, C.M. Nanotube nanotweezers. *Science* 286, 2148-2150 (1999).
- Kim, S.R., Lee, D.Y., Chung, E.S., Oh, U.T., Kim, S.U., and Jin, B.K. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 25, 662-671 (2005).
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248 (1996).
- Kisin, E.R., Murray, A.R., Keane, M.J., Shi, X.C., Schwegler-Berry, D., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W.E., Kagan, V.E., and Shvedova, A.A. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70, 2071-2079 (2007).
- Koike, E. and Kobayashi, T. Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere* 65, 946-951 (2006).
- Kolek, M.J., Carlquist, J.F., Muhlestein, J.B., Whiting, B.M., Horne, B.D., Bair, T.L., and Anderson, J.L. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am. Heart J.* 148, 1034-1040 (2004).
- Kong, J., Franklin, N.R., Zhou, C., Chapline, M.G., Peng, S., Cho, K., and Dai, H. Nanotube molecular wires as chemical sensors. *Science* 287, 622-625 (2000).
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., and van Oers, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420 (1994).
- Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M., and Bianco, A. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat. Nanotechnol.* 2, 108-113 (2007).
- Koyama, S., Endo, M., Kim, Y.-A., Hayashi, T., Yanagisawa, T., Osaka, K., Koyama, H., Haniu, H., and Kuroiwa, N. Role of systemic T-cells and histopathological aspects after subcutaneous implantation of various carbon nanotubes in mice. *Carbon* 44, 1079-1092 (2006).
- Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ränge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., and Alyautdin, R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug Target* 10, 317-325 (2002).

Kreyling, W.G., Semmler, M., and Moller, W. Dosimetry and toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 17, 140-152 (2004).

Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., and Ziesenis, A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1513-1530 (2002).

Kroto, H. Fullerene science--a most international endeavor. *J. Mol. Graph. Model.* 19, 187-188 (2001).

Krug, H.F. and Diabaté, S. Ultrafeine Partikel: Gesundheitsrisiko versus Therapiechance!?. *umwelt-medizin-gesellschaft* 16, 250-255 (2003).

Kümpel, E.D., Tran, C.L., Castranova, V., and Bailer, A.J. Lung dosimetry and risk assessment of nanoparticles: evaluating and extending current models in rats and humans. *Inhal. Toxicol.* 18, 717-724 (2006).

Kumagai, N., Morii, N., Fujisawa, K., Yoshimasa, T., Nakao, K., and Narumiya, S. Lysophosphatidic acid induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP-kinase and focal adhesion kinase in cultured Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 329, 273-276 (1993).

Laaksonen, T., Santos, H., Vihola, H., Salonen, J., Riikonen, J., Heikkila, T., Peltonen, L., Kumar, N., Murzin, D.Y., Lehto, V.P., and Hirvonen, J. Failure of MTT as a toxicity testing agent for mesoporous silicon microparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1913-1918 (2007).

Lämmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).

Lakshman, N., Kim, A., Bayless, K.J., Davis, G.E., and Petroll, W.M. Rho plays a central role in regulating local cell-matrix mechanical interactions in 3D culture. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 434-445 (2007).

Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., and Hunter, R.L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77, 126-134 (2004).

Lambert, A.L., Mangum, J.B., DeLorme, M.P., and Everitt, J.I. Ultrafine carbon black particles enhance respiratory syncytial virus-induced airway reactivity, pulmonary inflammation, and chemokine expression. *Toxicol. Sci.* 72, 339-346 (2003).

Lander, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11, 118-124 (1997).

Lebedkin, S., Schweiss, P., Renker, B., Malik, S., Hennrich, F., Neumaier, M., Störmer, C., and Kappes, M. Single-wall carbon nanotubes with diameters approaching 6 nm obtained by laser vaporization. *Carbon* 40, 417-423 (2002).

Leeuw, T.K., Reith, R.M., Simonette, R.A., Harden, M.E., Cherukuri, P., Tsyboulski, D.A., Beckingham, K.M., and Weisman, R.B. Single-walled carbon nanotubes in the intact organism: near-IR imaging and biocompatibility studies in *Drosophila*. *Nano. Lett.* 7, 2650-2654 (2007).

- Lemanske, R.F., Jr. Inflammatory events in asthma: an expanding equation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, S633-S636 (2000).
- Lenardi, C., Perego, C., Cassina, V., Podesta, A., D'Amico, A., Gualandris, D., Vinati, S., Fiorentini, F., Bongiorno, G., Piserj, P., Vellea, S.F., and Milani, P. Adhesion and proliferation of fibroblasts on cluster-assembled nanostructured carbon films: the role of surface morphology. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 3718-3730 (2006).
- Leonarduzzi, G., Arkan, M.C., Basaga, H., Chiarpotto, E., Sevanian, A., and Poli, G. Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1370-1378 (2000).
- Leong, L., Hughes, P.E., Schwartz, M.A., Ginsberg, M.H., and Shattil, S.J. Integrin signaling: roles for the cytoplasmic tails of alpha IIb beta 3 in the tyrosine phosphorylation of pp125FAK. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 12), 3817-3825 (1995).
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., and Nel, A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111, 455-460 (2003).
- Li, X., Tupper, J.C., Bannerman, D.D., Winn, R.K., Rhodes, C.J., and Harlan, J.M. Phosphoinositide 3 kinase mediates Toll-like receptor 4-induced activation of NF-kappa B in endothelial cells. *Infect. Immun.* 71, 4414-4420 (2003).
- Li, Z., Hulderman, T., Salmen, R., Chapman, R., Leonard, S.S., Young, S.H., Shvedova, A., Luster, M.I., and Simeonova, P.P. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 115, 377-382 (2007).
- Lien, E. and Ingalls, R.R. Toll-like receptors. *Crit. Care Med.* 30, S1-11 (2002).
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D., and Stark, W.J. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9370-9376 (2005).
- Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass, R.N., Bruinink, A., and Stark, W.J. 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 (2007).
- Long, R.Q. and Yang, R.T. Carbon nanotubes as superior sorbent for dioxin removal. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2058-2059 (2001).
- Long, T.C., Saleh, N., Tilton, R.D., Lowry, G.V., and Veronesi, B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4346-4352 (2006).
- Long, T.C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G.V., and Veronesi, B. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ. Health Perspect.* 115, 1631-1637 (2007).

- Lovat, V., Pantarotto, D., Lagostena, L., Cacciari, B., Grandolfo, M., Righi, M., Spalluto, G., Prato, M., and Ballerini, L. Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano. Lett.* 5, 1107-1110 (2005).
- Lu, J., Rao, M.P., Macdonald, N.C., Khang, D., and Webster, T.J. Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features. *Acta Biomater.* 4, 192-201 (2008).
- Lucarelli, M., Gatti, A.M., Savarino, G., Quattroni, P., Martinelli, L., Monari, E., and Boraschi, D. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur. Cytokine Netw.* 15, 339-346 (2004).
- Luo, B.H., Carman, C.V., and Springer, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 619-647 (2007).
- Ma, C., Wang, J., and Luo, J. Activation of nuclear factor kappa B by diesel exhaust particles in mouse epidermal cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1975-1983 (2004).
- MacDonald, R.A., Laurenzi, B.F., Viswanathan, G., Ajayan, P.M., and Stegemann, J.P. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 74, 489-496 (2005).
- Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J.W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., and Forro, L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano. Lett.* 6, 1121-1125 (2006).
- Malhotra, V., Shanley, T.P., Pittet, J.F., Welch, W.J., and Wong, H.R. Geldanamycin inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 92-97 (2001).
- Mangum, J.B., Turpin, E.A., ntao-Menezes, A., Cesta, M.F., Bermudez, E., and Bonner, J.C. Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages in situ. *Part. Fibre Toxicol.* 3, 15 (2006).
- Manna, S.K., Rangasamy, T., Wise, K., Sarkar, S., Shishodia, S., Biswal, S., and Ramesh, G.T. Long term environmental tobacco smoke activates nuclear transcription factor-kappa B, activator protein-1, and stress responsive kinases in mouse brain. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1602-1609 (2006).
- Manna, S.K., Sarkar, S., Barr, J., Wise, K., Barrera, E.V., Jejelowo, O., Rice-Ficht, A.C., and Ramesh, G.T. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes. *Nano. Lett.* 5, 1676-1684 (2005).
- Manning, C.B., Vallyathan, V., and Mossman, B.T. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *Int. Immunopharmacol.* 2, 191-200 (2002).
- Martin, L.D., Krunkosky, T.M., Dye, J.A., Fischer, B.M., Jiang, N.F., Rochelle, L.G., Akley, N.J., Dreher, K.L., and Adler, K.B. The role of reactive oxygen and nitrogen

- species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1301-1307 (1997).
- Martin, T.R. and Frevert, C.W. Innate immunity in the lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2, 403-411 (2005).
- Masciangioli, T. and Zhang, W.X. Environmental technologies at the nanoscale. *Environ. Sci. Technol.* 37, 102A-108A (2003).
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., and Seya, T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 171, 3154-3162 (2003).
- Matsumura, F., Totsukawa, G., Yamakita, Y., and Yamashiro, S. Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis. *Cell Struct. Funct.* 26, 639-644 (2001).
- Matsunaga, T. and Sakaguchi, T. Molecular mechanism of magnet formation in bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 1-13 (2000).
- Mattson, M.E. and Guidotti, T.L. Health risks associated with residence near a primary copper smelter: a preliminary report. *Am. J. Ind. Med.* 1, 365-374 (1980).
- Maynard, A., Baron, P., Foley, M., Shvedova, A., Kisin, E., and Castranova, V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J. Toxicol. Environ. Health A* 67, 87-107 (2004).
- Maynard, A., Ku, B.K., Emery, M., Stolzenburg, M., and McMurry, P.H. Measuring particle size-dependent physicochemical structure in airborne single-walled carbon nanotube agglomerates. *J. Nanopart. Res.* 9, 85-92 (2007).
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397 (1997).
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C.A., Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258 (1998).
- Meng, J., Song, L., Xu, H., Kong, H., Wang, C., Guo, X., and Xie, S. Effects of single-walled carbon nanotubes on the functions of plasma proteins and potentials in vascular prostheses. *Nanomedicine.* 1, 136-142 (2005).
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A., and Karin, M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81, 1147-1157 (1995).
- Mitchell, L.A., Gao, J., Wal, R.V., Gigliotti, A., Burchiel, S.W., and McDonald, J.D. Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol. Sci.* 100, 203-214 (2007).
- Monteiro-Riviere, N.A. and Inman, A.O. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* 44, 1070-1078 (2006).

- Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich, R.J., Inman, A.O., Wang, Y.Y., and Riviere, J.E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 155, 377-384 (2005).
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63 (1983).
- Mossman, B.T. and Churg, A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1666-1680 (1998).
- Mossman, B.T., Bignon, J., Corn, M., Seaton, A., and Gee, J.B. Asbestos: scientific developments and implications for public policy. *Science* 247, 294-301 (1990).
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B., and Lison, D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 221-231 (2005).
- Munzel, T., Afanas'ev, I.B., Kleschyov, A.L., and Harrison, D.G. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1761-1768 (2002).
- Murr, L.E. Cytotoxicity Assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2, 31-42 (2005).
- Murr, L.E., Esquivel, E.V., and Bang, J.J. Characterization of nanostructure phenomena in airborne particulate aggregates and their potential for respiratory health effects. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 237-247 (2004).
- Murr, L.E., Esquivel, E.V., Bang, J.J., de la, R.G., and Gardea-Torresdey, J.L. Chemistry and nanoparticulate compositions of a 10,000 year-old ice core melt water. *Water Res.* 38, 4282-4296 (2004).
- Nel, A. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. *Science* 308, 804-806 (2005).
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., and Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622-627 (2006).
- Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., and Nemery, B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol. Lett.* 149, 243-253 (2004).
- Nimmagadda, A., Thurston, K., Nollert, M.U., and McFetridge, P.S. Chemical modification of SWNT alters in vitro cell-SWNT interactions. *J. Biomed. Mater. Res. A* 76, 614-625 (2006).
- Ning, Y., Imrich, A., Goldsmith, C.A., Qin, G., and Kobzik, L. Alveolar macrophage cytokine production in response to air particles in vitro: role of endotoxin. *J. Toxicol. Environ. Health A* 59, 165-180 (2000).
- Oberdörster, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health Perspect.* 112, 1058-1062 (2004).

Oberdörster, E., Zhu, S., Blickley, T.M., McClellan-Green, P., and Haasch, M.L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms. *Carbon* 44 (2006).

Oberdörster, G. and Utell, M.J. Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract- and beyond? *Environ. Health Perspect.* 110 (2002).

Oberdörster, G. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal. Toxicol.* 8 Suppl, 73-89 (1996).

Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A.C. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 96, 5-74 (2000).

Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823-839 (2005).

Ogawa, Y., Kobayashi, T., Nishioka, A., Kariya, S., Hamasato, S., Seguchi, H., and Yoshida, S. Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells. *Int. J. Mol. Med.* 11, 149-152 (2003).

Ohashi, T., Mizutani, A., Murakami, A., Kojo, S., Ishii, T., and Taketani, S. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 511, 21-27 (2002).

Okeson, C.D., Riley, M.R., and Riley-Saxton, E. In vitro alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals. *Toxicol. In Vitro* 18, 673-680 (2004).

Okeson, C.D., Riley, M.R., Fernandez, A., and Wendt, J.O. Impact of the composition of combustion generated fine particles on epithelial cell toxicity: influences of metals on metabolism. *Chemosphere* 51, 1121-1128 (2003).

Okumura, A., Goto, M., Goto, T., Yoshinari, M., Masuko, S., Katsuki, T., and Tanaka, T. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2). *Biomaterials* 22, 2263-2271 (2001).

Osier, M. and Oberdörster, G. Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam. Appl. Toxicol.* 40, 220-227 (1997).

Otsuka, H., Nagasaki, Y., and Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 403-419 (2003).

Owens, L.V., Xu, L., Craven, R.J., Dent, G.A., Weiner, T.M., Kornberg, L., Liu, E.T., and Cance, W.G. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.* 55, 2752-2755 (1995).

Özdemir, S. Untersuchung zur Genotoxizität durch ultrafeine und feine Partikel. Diplomarbeit (2007).

- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13766-13771 (2000).
- Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866 (1999).
- Palecanda, A., Paulauskis, J., Al Mutairi, E., Imrich, A., Qin, G., Suzuki, H., Kodama, T., Tryggvason, K., Koziel, H., and Kobzik, L. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J. Exp. Med.* 189, 1497-1506 (1999).
- Pantarotto, D., Briand, J.P., Prato, M., and Bianco, A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem. Commun. (Camb. )* 1, 16-17 (2004).
- Pantarotto, D., Partidos, C.D., Graff, R., Höbeke, J., Briand, J.P., Prato, M., and Bianco, A. Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6160-6164 (2003).
- Pellegrino, T., Kudera, S., Liedl, T., Munoz, J.A., Manna, L., and Parak, W.J. On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications. *Small* 1, 48-63 (2005).
- Pellegrino, T., Parak, W.J., Boudreau, R., Le Gros, M.A., Gerion, D., Alivisatos, A.P., and Larabell, C.A. Quantum dot-based cell motility assay. *Differentiation* 71, 542-548 (2003).
- Peng, H., Alemany, L.B., Margrave, J.L., and Khabashesku, V.N. Sidewall carboxylic acid functionalization of single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 15174-15182 (2003).
- Pensabene, V., Vittorio, O., Raffa, V., Menciassi, A., and Dario, P. Investigation of CNTs interaction with fibroblast cells. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 1, 6620-6623 (2007).
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R., and Lacal, J.C. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11, 463-475 (1997).
- Peters, K., Unger, R.E., Kirkpatrick, C.J., Gatti, A.M., and Monari, E. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 321-325 (2004).
- Phenrat, T., Saleh, N., Sirk, K., Tilton, R.D., and Lowry, G.V. Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 284-290 (2007).
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van, H.C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088 (1998).

- Pope, C.A., III, Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., and Thurston, G.D. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287, 1132-1141 (2002).
- Prato, M., Kostarelos, K., and Bianco, A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* 41, 60-68 (2007).
- Puck, T.T. and Marcus, P.I. Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103, 653-666 (1956).
- Pulskamp, K., Diabaté, S., and Krug, H.F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol. Lett.* 168, 58-74 (2007).
- Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M., Hennrich, F., Kern, K., and Krug, H.F. Human lung epithelial cells show biphasic oxidative burst after single-walled carbon nanotube contact. *Carbon* 45, 2241-2249 (2007).
- Quay, J.L., Reed, W., Samet, J., and Devlin, R.B. Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kappaB activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 98-106 (1998).
- Rahman, I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 1, 291-315 (2002).
- Raja, P.M., Connolley, J., Ganesan, G.P., Ci, L., Ajayan, P.M., Nalamasu, O., and Thompson, D.M. Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells. *Toxicol. Lett.* 169, 51-63 (2007).
- Rastogi, S.K., Gupta, B.N., Mathur, N., Husain, T., Mahendra, P.N., Pangtey, B.S., and Srivastava, S. A survey of chronic bronchitis among brassware workers. *Ann. occup. Hyg.* 36, 283-294 (1992).
- Ravanti, L., Heino, J., Lopez-Otin, C., and Kahari, V.M. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 2446-2455 (1999).
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., Sieg, D.J., Otey, C.A., Schläpfer, D.D., and Schwartz, M.A. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 20), 3673-3678 (2000).
- Ren, Z.F., Huang, Z.P., Xu, J.W., Wang, J.H., Bush, P., Siegal, M.P., and Provencio, P.N. Synthesis of large arrays of well-aligned carbon nanotubes on glass. *Science* 282, 1105-1107 (1998).
- Renwick, L.C., Brown, D., Clouter, A., and Donaldson, K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med.* 61, 442-447 (2004).
- Renwick, L.C., Donaldson, K., and Clouter, A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 119-127 (2001).

---

Rich, T., Allen, R., and Trowsdale, J. How low can toll go? *Trends Genet.* 16, 292-294 (2000).

Riediker, M., Cascio, W.E., Griggs, T.R., Herbst, M.C., Bromberg, P.A., Neas, L., Williams, R.W., and Devlin, R.B. Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 934-940 (2004).

Rinzler, A.G., Hafner, J.H., Nikolaev, P., Nordlander, P., Colbert, D.T., Smalley, R.E., Lou, L., Kim, S.G., and Tomanek, D. Unraveling Nanotubes: Field Emission from an Atomic Wire. *Science* 269, 1550-1553 (1995).

Roberts, A.P., Mount, A.S., Seda, B., Souther, J., Qiao, R., Lin, S., Ke, P.C., Rao, A.M., and Klaine, S.J. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3025-3029 (2007).

Robichaud, C.O., Tanzil, D., Weilenmann, U., and Wiesner, M.R. Relative risk analysis of several manufactured nanomaterials: an insurance industry context. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8985-8994 (2005).

Roskelley, C.D., Desprez, P.Y., and Bissell, M.J. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12378-12382 (1994).

Rota, C., Chignell, C.F., and Mason, R.P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 873-881 (1999).

Rothen-Rutishauser, B.M., Schurch, S., Hänni, B., Kapp, N., and Gehr, P. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4353-4359 (2006).

Royal Society and the Royal Academy of Engineering. *Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties*. London, UK, 116 (2004).

Ryan, K.A., Smith, M.F., Jr., Sanders, M.K., and Ernst, P.B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect. Immun.* 72, 2123-2130 (2004).

Saleh, D., Ernst, P., Lim, S., Barnes, P.J., and Giaid, A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J.* 12, 929-937 (1998).

Salvador-Morales, C., Flahaut, E., Sim, E., Sloan, J., Green, M.L., and Sim, R.B. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol. Immunol.* 43, 193-201 (2006).

Salvador-Morales, C., Townsend, P., Flahaut, E., Vénien-Bryan, C., Vlandas, A., Green, M.L.H., and Sim, R.B. Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes; potential for damage to lung immune defense mechanisms. *Carbon* 45, 607-617 (2007).

---

Samet, J.M., Dominici, F., Curriero, F.C., Coursac, I., and Zeger, S.L. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N. Engl. J. Med.* 343, 1742-1749 (2000).

Sarkar, S., Sharma, C., Yog, R., Periakaruppan, A., Jejelowo, O., Thomas, R., Barrera, E.V., Rice-Ficht, A.C., Wilson, B.L., and Ramesh, G.T. Analysis of stress responsive genes induced by single-walled carbon nanotubes in BJ Foreskin cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 584-592 (2007).

Sato, Y. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and subcutaneous tissue of rats *in vivo*. *Mol. BioSyst.* 1, 176-182 (2005).

Satoh, T. and Kaziro, Y. Ras in signal transduction. *Semin. Cancer Biol.* 3, 169-177 (1992).

Sayes, C.M., Fortner, J.D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A.M., Ausman, K.D., Tao, Y.J., Sitharaman, B., Wilson, L.J.H.J.B., West, J.L., and Colvin, V.L. The differential cytotoxicity of water-soluble Fullerenes. *Nano. Lett.* 4, 1881-1887 (2004).

Sayes, C.M., Liang, F., Hudson, J.L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J.M., Moore, V.C., Doyle, C.D., West, J.L., Billups, W.E., Ausman, K.D., and Colvin, V.L. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 161, 135-142 (2006).

Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., and Parsons, J.T. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5192-5196 (1992).

Schmid, G., Decker, M., Ernst, H., Fuchs, H., Grünwald, A., Hofmann, H., Mayor, M., Rathgeber, W., Simon, U., and Wyrwa, D. Small Dimensions and Material Properties: A Definition of Nanotechnology. *Europäische Akademie zur Erforschung von Folgen wissenschaftlich-technischer Entwicklungen, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Graue Reihe* 35 (2003).

Schreck, R., Rieber, P., and Bäumler, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-2258 (1991).

Schröder, A., Francz, G., Bruinink, A., Hauert, R., Mayer, J., and Wintermantel, E. Titanium containing amorphous hydrogenated carbon films (a-C: H/Ti): surface analysis and evaluation of cellular reactions using bone marrow cell cultures *in vitro*. *Biomaterials* 21, 449-456 (2000).

Schwartz, J., Ballester, F., Saez, M., Perez-Hoyos, S., Bellido, J., Cambra, K., Arribas, F., Canada, A., Perez-Boillos, M.J., and Sunyer, J. The concentration-response relation between air pollution and daily deaths. *Environ. Health Perspect.* 109, 1001-1006 (2001).

Seaton, A., MacNee, W., Donaldson, K., and Godden, D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345, 176-178 (1995).

Service, R.F. American Physical Society meeting. Carbon foam reveals a fleeting magnetic personality. *Science* 304, 42 (2004).

Sharma, C.S., Sarkar, S., Periyakaruppan, A., Barr, J., Wise, K., Thomas, R., Wilson, B.L., and Ramesh, G.T. Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 2466-2472 (2007).

Shim, M., Kam, N.W., Chen, R.J., Li, Y., and Dai, H. Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. *Nano. Lett.* 2, 285-288 (2002).

Shukla, A., Jung, M., Stern, M., Fukagawa, N.K., Taatjes, D.J., Sawyer, D., Van Houten, B., and Mossman, B.T. Asbestos induces mitochondrial DNA damage and dysfunction linked to the development of apoptosis. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 285, L1018-L1025 (2003).

Shukla, A., Ramos-Nino, M., and Mossman, B. Cell signaling and transcription factor activation by asbestos in lung injury and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1198-1209 (2003).

Shukla, A., Timblin, C., Berube, K., Gordon, T., McKinney, W., Driscoll, K., Vacek, P., and Mossman, B.T. Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 182-187 (2000).

Shvedova, A.A., Castranova, V., Kisin, E.R., Schwegler-Berry, D., Murray, A.R., Gandelsman, V.Z., Maynard, A., and Baron, P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 1909-1926 (2003).

Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Mercer, R., Murray, A.R., Johnson, V.J., Potapovich, A.I., Tyurina, Y.Y., Gorelik, O., Arepalli, S., Schwegler-Berry, D., Hubbs, A.F., Antonini, J., Evans, D.E., Ku, B.K., Ramsey, D., Maynard, A., Kagan, V.E., Castranova, V., and Baron, P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289, L698-L708 (2005).

Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Murray, A.R., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Young, S.H., Gao, F., Tyurina, Y.Y., Oury, T.D., and Kagan, V.E. Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 339-348 (2007).

Silva, G.A. Nanotechnology approaches for the regeneration and neuroprotection of the central nervous system. *Surg. Neurol.* 63, 301-306 (2005).

Simonart, T., Van Vooren, J.P., Parent, D., Heenen, M., and Boelaert, J.R. Role of iron in dermatology. *Dermatology* 200, 156-159 (2000).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191 (1988).

Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., and Kostarelos, K. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 3357-3362 (2006).

- Singh, R., Pantarotto, D., McCarthy, D., Chaloin, O., Höbeke, J., Partidos, C.D., Briand, J.P., Prato, M., Bianco, A., and Kostarelos, K. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 4388-4396 (2005).
- Sinha, R.K., Morris, F., Shah, S.A., and Tuan, R.S. Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 305, 258-272 (1994).
- Sinnett-Smith, J., Lunn, J.A., Leopoldt, D., and Rozengurt, E. Y-27632, an inhibitor of Rho-associated kinases, prevents tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin induced by bombesin: dissociation from tyrosine phosphorylation of p130(CAS). *Exp. Cell Res.* 266, 292-302 (2001).
- Smith, C.J., Shaw, B.J., and Handy, R.D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 82, 94-109 (2007).
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Göke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85 (1985).
- Somasundaran, P., Chakraborty, S., Qiang, Q., Deo, P., Wang, J., and Zhang, R. Surfactants, polymers and their nanoparticles for personal care applications. *J. Cosmet. Sci.* 55 Suppl, S1-17 (2004).
- Son, S.J., Bai, X., and Lee, S.B. Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine Part 1. Drug/gene delivery applications. *Drug Discov. Today* 12, 650-656 (2007).
- Star, A., Steuerman, D.W., Heath, J.R., and Stoddart, J.F. Starched carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 41, 2508-2512 (2002).
- Stearns, R.C., Paulauskis, J.D., and Godleski, J.J. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 108-115 (2000).
- Stone, V., Tuinman, M., Vamvakopoulos, J.E., Shaw, J., Brown, D., Petterson, S., Faux, S.P., Borm, P., MacNee, W., Michaelangeli, F., and Donaldson, K. Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur. Respir. J.* 15, 297-303 (2000).
- Strano, M.S., Moore, V.C., Miller, M.K., Allen, M.J., Haroz, E.H., Kittrell, C., Hauge, R.H., and Smalley, R.E. The role of surfactant adsorption during ultrasonication in the dispersion of single-walled carbon nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 3, 81-86 (2003).
- Suda, K., Rothen-Rutishauser, B., Gunthert, M., and Wunderli-Allenspach, H. Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 37, 505-514 (2001).
- Sydlik, U., Bierhals, K., Soufi, M., Abel, J., Schins, R.P., and Unfried, K. 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, L725-L733 (2006).
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376 (2003).
- Tan, X.M. and Fugetsu, B. Multi-walled carbon nanotubes interact with cultured rice cells: Evidence of a self-defense response. *J. Biomed. Nanotechnol.* 3, 285-288 (2007).
- Tasis, D., Tagmatarchis, N., Georgakilas, V., and Prato, M. Soluble carbon nanotubes. *Chemistry.* 9, 4000-4008 (2003).
- Templeton, R.C., Ferguson, P.L., Washburn, K.M., Scrivens, W.A., and Chandler, G.T. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7387-7393 (2006).
- Thurston, G.D. A critical review of PM10-mortality time-series studies. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 6, 3-21 (1996).
- Tian, F., Cui, D., Schwarz, H., Estrada, G.G., and Kobayashi, H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 20, 1202-1212 (2006).
- Tosi, G., Costantino, L., Rivasi, F., Ruozi, B., Leo, E., Vergoni, A.V., Tacchi, R., Bertolini, A., Vandelli, M.A., and Forni, F. Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. *J. Control Release* 122, 1-9 (2007).
- Towbin, H., Stähelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149 (1992).
- Tremblay, L., Hauck, W., Aprikian, A.G., Begin, L.R., Chapdelaine, A., and Chevalier, S. Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 68, 164-171 (1996).
- Tsuji, J.S., Maynard, A.D., Howard, P.C., James, J.T., Lam, C.W., Warheit, D.B., and Santamaria, A.B. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 89, 42-50 (2006).
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., and Aderem, A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401, 811-815 (1999).
- Utsunomiya, S., Jensen, K.A., Keeler, G.J., and Ewing, R.C. Uraninite and fullerene in atmospheric particulates. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4943-4947 (2002).
- van Eeden, S.F., Tan, W.C., Suwa, T., Mukae, H., Terashima, T., Fujii, T., Qui, D., Vincent, R., and Hogg, J.C. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164, 826-830 (2001).

- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39-51 (1995).
- Völkel, K., Krug, H.F., and Diabaté, S. Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J. Biosci.* 28, 51-55 (2003).
- Wagner, B.A., Teesch, L.M., Büttner, G.R., Britigan, B.E., Burns, C.P., and Reszka, K.J. Inactivation of anthracyclines by serum heme proteins. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 920-926 (2007).
- Wan, C.P., Myung, E., and Lau, B.H. An automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. *J. Immunol. Methods* 159, 131-138 (1993).
- Wang, H., Wang, J., Deng, X., Sun, H., Shi, Z., Gu, Z., Liu, Y., and Zhao, Y. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 1019-1024 (2004).
- Wang, N. and Ingber, D.E. Probing transmembrane mechanical coupling and cytomechanics using magnetic twisting cytometry. *Biochem. Cell Biol.* 73, 327-335 (1995).
- Wang, S., Humphreys, E.S., Chung, S.Y., Delduco, D.F., Lustig, S.R., Wang, H., Parker, K.N., Rizzo, N.W., Subramoney, S., Chiang, Y.M., and Jagota, A. Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nat. Mater.* 2, 196-200 (2003).
- Wang, W., Watari, F., Omori, M., Liao, S., Zhu, Y., Yokoyama, A., Uo, M., Kimura, H., and Ohkubo, A. Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 82, 223-230 (2007).
- Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A., and Webb, T.R. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77, 117-125 (2004).
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., and Narumiya, S. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16, 3044-3056 (1997).
- Watanabe, T., Hosoya, H., and Yonemura, S. Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 605-616 (2007).
- Wichmann, H.E., Spix, C., Tuch, T., Wolke, G., Peters, A., Heinrich, J., Kreyling, W.G., and Heyder, J. Daily mortality and fine and ultrafine particles in erfurt, germany part I: role of particle number and particle mass. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 98, 5-86 (2000).
- Wick, P., Manser, P., Limbach, L.K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W.J., and Bruinink, A. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 168, 121-131 (2007).

- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D., and Biswas, P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4336-4345 (2006).
- Williams, K.A., Veenhuizen, P.T., de la Torre, B.G., Eritja, R., and Dekker, C. Nanotechnology: carbon nanotubes with DNA recognition. *Nature* 420, 761 (2002).
- Wilson, M.R., Lightbody, J.H., Donaldson, K., Sales, J., and Stone, V. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 172-179 (2002).
- Wong, S.S., Joselevich, E., Woolley, A.T., Cheung, C.L., and Lieber, C.M. Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology. *Nature* 394, 52-55 (1998).
- Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., and Krug, H.F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano. Lett.* 6, 1261-1268 (2006).
- Wu, K.K. and Thiagarajan, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu. Rev. Med.* 47, 315-331 (1996).
- Wu, W., Graves, L.M., Jaspers, I., Devlin, R.B., Reed, W., and Samet, J.M. Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am. J. Physiol* 277, L924-L931 (1999).
- Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R., and Nel, A.E. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano. Lett.* 6, 1794-1807 (2006).
- Xu, A., Zhou, H., Yu, D.Z., and Hei, T.K. Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species. *Environ. Health Perspect.* 110, 1003-1008 (2002).
- Yamada, K.M. and Miyamoto, S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 681-689 (1995).
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668-6672 (2002).
- Yamamoto, S., Tanaka, M., Sunami, H., Ito, E., Yamashita, S., Morita, Y., and Shimomura, M. Effect of honeycomb-patterned surface topography on the adhesion and signal transduction of porcine aortic endothelial cells. *Langmuir* 23, 8114-8120 (2007).
- Yano, Y., Geibel, J., and Sumpio, B.E. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. *Am. J. Physiol.* 271, C635-C649 (1996).
- Yegles, M., Janson, X., Dong, H.Y., Renier, A., and Jaurand, M.C. Role of fibre characteristics on cytotoxicity and induction of anaphase/telophase aberrations in rat pleural mesothelial cells in vitro: correlations with in vivo animal findings. *Carcinogenesis* 16, 2751-2758 (1995).

---

Yin, Z., Ivanov, V.N., Habelhah, H., Tew, K., and Ronai, Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res.* 60, 4053-4057 (2000).

Zandonella, C. Is it all just a pipe dream? *Nature* 410, 734-735 (2001).

Zanello, L.P., Zhao, B., Hu, H., and Haddon, R.C. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano. Lett.* 6, 562-567 (2006).

Zhang, D., Yi, C., Zhang, Y., Chen, Y., Yao, X., and Yang, M. The effects of carbon nanotubes on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Nanotechnology* 18, 1-9 (2007).

Zhang, H., Tay, P.N., Cao, W., Li, W., and Lu, J. Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett.* 532, 171-176 (2002).

Zhang, L.W., Zeng, L., Barron, A.R., and Monteiro-Riviere, N.A. Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes. *Int. J. Toxicol.* 26, 103-113 (2007).

Zhang, Y.B., Kanungo, M., Ho, A.J., Freimuth, P., van der, L.D., Chen, M., Khamis, S.M., Datta, S.S., Johnson, A.T., Misewich, J.A., and Wong, S.S. Functionalized carbon nanotubes for detecting viral proteins. *Nano. Lett.* 7, 3086-3091 (2007).

Zheng, M., Jagota, A., Semke, E.D., Diner, B.A., McLean, R.S., Lustig, S.R., Richardson, R.E., and Tassi, N.G. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat. Mater.* 2, 338-342 (2003).

Zhou, Y.M., Zhong, C.Y., Kennedy, I.M., Leppert, V.J., and Pinkerton, K.E. Oxidative stress and NF $\kappa$ B activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190, 157-169 (2003).

Zhu, H.W., Xu, C.L., Wu, D.H., Wei, B.Q., Vajtai, R., and Ajayan, P.M. Direct synthesis of long single-walled carbon nanotube strands. *Science* 296, 884-886 (2002).

Zhu, L., Chang, D.W., Dai, L., and Hong, Y. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano. Lett.* 7, 3592-3597 (2007).

## 7 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CB	Carbon Black
CNT	Carbon Nanotube
CVD	Chemische Gasphasenabscheidungs-Technik, Chemical Vapor Deposition
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DHE	Dihydroehtidium
DHR 123	Dihydrorhodamine 123
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin tetraessigsäure
EPA	Environmental Protection Agency
EZM	Extrazellulären Matrix
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FAK	Fokale Adhäsions Kinase, Focal Adhesion Kinase
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FITC t	Fluorescein-Isothiocyana
FKS	Fötales Kälberserum
GAP	GTPase-activating Protein
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	Meerrettichperoxidase
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission
IKK	IkappaB Kinase
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
IRAK	IL-1R-associated kinase

---

LDH	Laktatdehydrogenase
LPA	Oleoyl-L- $\alpha$ -lysophosphatidic acid sodium salt
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein
MLC	Myosin Light Chain
MMP	Mitochondriales Membranpotential
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dioxyphenyl-Tetrazoliumbromid
MWCNT	Multi-walled Carbon Nanotube
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NNI	U.S. National Nanotechnology Initiative
NP40	Nonylphenyl-polyethylene glycol (Igepal CA-630)
NSTC	National Science and Technology Council
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglutaminsäure
PI	Propidiumiodid
PM	Partikelmasse (Particulate Matter)
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PMSF	Phenylmethyl-sulfonyl-fluorid
PS	Phosphatidylserin
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIN-1	3-Morpholinopyridonimine hydrochloride
SOD	Superoxiddismutase
SWCNT	Single-walled Carbon Nanotube
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	TOLL-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TMRE	Tetramethylrhodaminester

TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TRAF	Tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor-6
WST	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen:

Abb. 2.1:	Typische Größenverteilung von urbanen Partikeln.....	5
Abb. 2.2:	Lokale und systemische Effekte nach Partikelexposition.....	9
Abb. 2.3:	Kohlenstoff Nanoröhren.....	17
Abb. 2.4:	Nanopartikel-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)...	20
Abb. 2.5:	Schematische Darstellung der Aktivierung von NFκB über TLRs und den MyD88-abhängigen Signalweg.....	23
Abb. 2.6:	Schematische Darstellung der Aktivierung von „ <i>Focal Adhesions</i> “ und Stressfasern über pFAK und Rho.....	26
Abb. 3.1:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von der verwendeten Epithel- (A549) und Endothel-ähnlichen- (ECV304) Zelllinie.....	32
Abb. 3.2:	Reaktion der MTT-Formazanbildung.....	40
Abb. 3.3:	Reaktion des LDH-Tests.....	42
Abb. 3.4:	Reaktion des WST-1-Tests zur Formazan-Bildung.....	43
Abb. 3.5:	Dot Blot Analyse von Propidiumiodid- und Annexin V-FITC-Färbung.....	45
Abb. 3.6:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Dot Blot Analyse von A549 Zellen nach TMRE-Färbung.....	47
Abb. 3.7:	Reaktion der Umwandlung von H <sub>2</sub> DCF-DA zu DCF durch ROS/RNS.....	49
Abb. 3.8:	Reaktion von DHR123 zum fluoreszierenden Rhodamine123 durch Radikale.....	50
Abb. 3.9:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A549 Zellen nach DHE-Färbung.....	52
Abb. 3.10:	Reaktion der BCA-Poteinmengenbestimmung.....	54
Abb. 4.1:	Suspendierte <i>Carbon Nanotubes</i> zeigen ein unterschiedliches Agglomerationsverhalten nach Ultraschallbehandlung in H <sub>2</sub> O bidest.....	64
Abb. 4.2:	Transmissionselektronische-Aufnahmen von <i>Carbon Nanotubes</i> .....	65
Abb. 4.3:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von A549 Zellen nach 24h Partikelinkubation (15,6 µg/cm <sup>2</sup> [50 µg/ml].....	67

---

Abb. 4.4:	Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahmen von A549 und ECV304 Zellen nach 24h Partikelinkubation mit <i>Carbon Nanotubes</i> ( $68,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ [ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ]).....	69
Abb. 4.5:	Effekte von <i>Carbon Nanotubes</i> auf die Vitalität von Zellen.....	72
Abb. 4.6:	TEM Präparationen von SWCNT a.t. nach 2h Inkubation mit verschiedenen Tetrazoliumsätzen.....	74
Abb. 4.7:	Durchflusszytometrische-Analyse der Annexin V-Färbung.....	77
Abb. 4.8:	Wachstumsverhalten von A549 Zellen nach <i>Carbon Nanotube</i> Inkubation ( $15,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; [ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ]).....	79
Abb. 4.9:	DNA-Syntheserate von A549 Zellen nach <i>Carbon Nanotube</i> Inkubation...80	
Abb. 4.10:	<i>Carbon Nanotube</i> -induzierte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies.83	
Abb. 4.11:	Vergleich der ROS-Induktion nach 10 Minuten und 24 Stunden CNT-Inkubation von A549 Zellen.....	85
Abb. 4.12:	Übersicht über die Aufreinigung von <i>Carbon Nanotubes</i> mithilfe von Dimethylformamide (DMF).....	87
Abb. 4.13:	ROS-Freisetzung nach 10 Minuten und 24 Stunden Inkubation von A549 Zellen mit DMF-aufgereinigten CNTs.....	88
Abb. 4.14:	Peroxyinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) Bildung nach 10 Minuten und 24 Stunden <i>Carbon Nanotube</i> Inkubation von A549 Zellen.....	90
Abb. 4.15:	Produktion von Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) in A549 Zellen nach Stimulation mit <i>Carbon Nanotubes</i> für 10 Minuten und 24 Stunden.....	91
Abb. 4.16:	ROS-Entwicklung durch <i>Carbon Nanotubes</i> im zellfreien System.....	93
Abb. 4.17:	TMRE Färbung von A549 Zellen zur Ermittlung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) nach Behandlung mit $23,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) <i>Carbon Nanotubes</i> .....	95
Abb. 4.18:	Zeitlicher Verlauf der Veränderung des Mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) in A549 Zellen nach <i>Carbon Nanotube</i> Inkubation.....	97
Abb. 4.19:	Translokation von p65 in den Kern nach <i>Carbon Nanotube</i> Behandlung: (A) NT-1 (B) SWCNT a.t. (C) CB14.....	100
Abb. 4.20:	Schematische Darstellung der möglichen ROS-induzierten p65 Translokation in den Kern nach Partikel-Behandlung.....	102

---

Abb. 4.21:	Aktivierung von p65 nach Co-Inkubation von NAC und <i>Carbon Nanotubes</i> .....	103
Abb. 4.22:	Schematische Darstellung einer möglichen Interaktion von Partikeln mit dem TLR4 Rezeptor und der Aktivierung des NFκB- Signalweges über das Adaptorprotein MyD88.....	105
Abb. 4.23:	Western Blot Analysen von TLR4 und MyD88 nach <i>Carbon Nanotube</i> Inkubation.....	106
Abb. 4.24:	Zusammenfassende schematische Darstellung der Aktivierung des NFκB-Signalweges durch <i>Carbon Nanotubes</i> .....	107
Abb. 4.25:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten A549 Kontrollzellen.....	111
Abb. 4.26:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von <i>Carbon Nanotube</i> behandelten Zellen (A549).....	113
Abb. 4.27:	Aktivierung der „ <i>Focal Adhesion</i> “ Signalkaskade durch <i>Carbon Nanotubes</i> .....	116
Abb. 4.28:	Zusammenfassend schematische Darstellung der Aktivierung des „ <i>Focal Adhesion</i> “ Signalweges nach <i>Carbon Nanotube</i> Inkubation.....	117
Abb. 5.1:	Schematische Darstellung der aktuellen Arbeitshypothese von <i>Carbon Nanotube</i> -induzierten zellulären Mechanismen in humanen Lungenzellen.....	163
 <b><u>Tabellen:</u></b>		
Tab. 3.1:	Zusammensetzung des Kulturmediums für A549 Zellen (500 ml).....	31
Tab. 3.2:	Zusammensetzung des Kulturmediums für ECV304 Zellen (500 ml).....	32
Tab. 3.3:	Materialcharakterisierung und Elementanalyse der verwendeten Partikel (Gewichts-%).....	36
Tab. 3.4:	Material, Puffer und Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	38
Tab. 3.5:	Material und Lösungen für den MTT-Test.....	41
Tab. 3.6:	Material und Lösungen für den LDH-Test.....	42
Tab. 3.7:	Material und Lösungen für den WST-1-Test.....	43
Tab. 3.8:	Material und Lösungen für die Annexin V-FITC- und PI-Färbung.....	46

Tab. 3.9:	Material und Lösungen für die TMRE-Färbung.....	48
Tab. 3.10:	Material und Lösungen für den DCF-Test.....	50
Tab. 3.11:	Material und Lösungen für den DHR123-Test.....	51
Tab. 3.12:	Material und Lösungen für die DHE-Färbung.....	52
Tab. 3.13:	Material und Lösungen für den BrdU-Test.....	53
Tab. 3.14:	Material und Lösungen für die Proteinextraktion.....	56
Tab. 3.15:	Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.....	57
Tab. 3.16:	Material und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Elektrophorese.....	57
Tab. 3.17:	Material und Lösungen für das Blotten.....	58
Tab. 3.18:	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für die Proteinanalytik (Western Blot).....	59
Tab. 3.19:	Material und Lösungen für den immunologischen Nachweis von Proteinen.....	60
Tab. 3.20:	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	61
Tab. 3.21:	Material und Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	62

## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Hennrich, F., Kern, K., and Krug, H.F.** Human lung epithelial cells show biphasic burst after single-walled carbon nanotube contact. Carbon 45, 2241-2249 (2007).

**Pulskamp, K., Diabate, S., and Krug, H.F.** Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. Toxicol. Lett. 168, 58-74 (2007).

**Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., and Krug, H.F.** Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. Nano. Lett. 6, 1261-1268 (2006).

### Vorträge:

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Krug, H.F.** Carbon nanotubes and their influence on cell viability and function. 44<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, Oktober 2007.

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Krug, H.F.** The impact of carbon nanotubes on cell viability and function. 3. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe Biologie, Pharmakologie und Toxikologie, Reisensburg, Günzburg, Juni, 2006.

### Posterbeiträge:

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Krug, H.F..** 44<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, Oktober 2007.

---

**Schleh, C., Pulskamp, K., Krug, N., Müller, M., Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M.** 44<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, Oktober 2007.

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Krug, H.F.** Effects of new carbon conformations on cellular behaviour. GAeF-Meeting: Workshop on Exhaust Gas particles in the Atmosphere, Karlsruhe, Juli 2006.

**Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K, Krug, H.F.** On carbon nanotubes that fake acute toxicity in cultured human lung cells.10<sup>th</sup> Joint Meeting: ‘Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes’, Weimar, November 2006.

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Krug, H.F.** Carbon nanotubes lead to adverse effects on cell function and viability. 10<sup>th</sup> International Inhalation Symposium (INIS), Hannover, Juni 2006.

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Krug, H.F.** Effects of new carbon conformations on cell viability and function. 57. Mosbacher Kolloquium ‘Redoxsignaling’, Mosbach (Baden), April 2006.

**Pulskamp, K., Wörle-Knirsch, J.M, Krug, H.F.** Effects of carbon nanotubes on cell physiology. CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, September 2005.

**Diabate, S., Pulskamp, K., and Krug, H.F.** Carbon nanotubes induce oxidative stress, inflammatory responses and cell death in pulmonary cells. 8<sup>th</sup> Joint Meeting: ‘Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes’, Weimar, November 2004.

---