

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Patrick Meybohm

**In Vitro Toxizität der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid für die  
Medikamentenapplikation**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Tanja Susanne Gegg  
aus Aindling

Würzburg, Mai 2022

1. Überarbeitung Februar 2023



Referent: apl. Prof. Dr. med. Jens-Albert Broscheit

Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2023

Die Promovendin ist Ärztin

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Nanopartikel und Drug Targeting	5
1.2	Graphen Nanopartikel	7
1.3	Siliciumdioxid Nanopartikel	9
1.4	Zellzyklus, Apoptose und Nekrose	11
1.5	Ziel dieser Arbeit	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Material	13
2.2	Zellkultur	18
2.2.1	Zelllinien	18
2.2.2	Kultivierung der Zellen	19
2.2.3	Kryokonservierung der Zellen	21
2.2.4	Auftauen von kryokonservierten Zellen	21
2.3	Substanzen in Suspension mit Medium bringen	21
2.4	Zellviabilität	22
2.4.1	Zellkultivierung und Inkubation der Substanzen auf 96-Well-Platten	22
2.4.2	EZ4U-Test	24
2.4.3	MTT-Test	25
2.4.4	LDH-Test	25
2.4.5	CellTiter-Glo Assay	26
2.5	Apoptose-Marker Bax und Caspase 3	26
2.5.1	Zellkultivierung und Inkubation der Substanzen auf 6-Well-Platten	27
2.5.2	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)	28
2.5.3	Western Blot	31
2.6	Statistische Auswertung	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Zellviabilität	41
3.1.1	EZ4U-Test	43

3.1.2	CellTiter-Glo Assay	48
3.2	Apoptose-Marker Bax und Caspase 3	53
3.2.1	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)	54
3.2.2	Western Blot	62
4	Diskussion	74
5	Zusammenfassung	85
6	Literaturverzeichnis	88
I.	Abkürzungsverzeichnis	93
II.	Abbildungsverzeichnis	95
III.	Tabellenverzeichnis	100
IV.	Danksagung	101
V.	Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme	102

# 1 Einleitung

## 1.1 Nanopartikel und Drug Targeting

Ein Nanopartikel, auch Nanoteilchen oder Nanoobjekt genannt, ist definiert als ein Material mit einer, zwei oder drei Außenabmessungen, welche im Nanomaßstab, das heißt in einem Größenbereich von 1 nm bis 100 nm, vorliegen. Somit werden Nanopartikel einzig über ihre Größe und nicht über ihre chemische Beschaffenheit definiert. Nanopartikel können aus einem einzigen Element oder aus Verbindungen, sowie aus organischem oder anorganischem Material bestehen (DaNa, o.J.-b). Es gibt Nanopartikel die natürlich vorkommen und solche die künstlich hergestellt werden, sei es durch gezielte Synthese oder als ungewolltes, vielleicht sogar unerwünschtes Nebenprodukt. So entstehen natürliche Nanopartikel beispielsweise bei Vulkanausbrüchen oder bei Waldbränden. Zudem kommen in der Natur auch sehr feine Sandkörner vor, die aufgrund ihrer Größe den Nanopartikeln zugeordnet werden. Künstlich hergestellte Nanopartikel entstehen beispielsweise als Nebenprodukt bei Verbrennungsmotoren. Doch Nanopartikel werden auch gezielt synthetisiert, um sich ihre besonderen Eigenschaften zunutze zu machen. Was die Nanopartikel so besonders macht, ist ihre große Oberfläche bei kleinem Volumen. Ein Nanopartikel besteht aus wenigen bis mehreren tausend Atomen, von denen sich eine Vielzahl an der Oberfläche des Nanopartikels befindet. Diese oberflächlichen Atome besitzen in Ermangelung ausreichender Nachbar-Atome viele ungesättigte Bindungen und haben daher eine erhöhte Bereitschaft Bindungen mit anderen Substanzen einzugehen. Dies birgt viele potenzielle Anwendungsmöglichkeiten. Jedoch können dadurch auch neue Materialeigenschaften entstehen, welche das gleiche Material in größerer Form nicht besitzt. Dies kann sich auch auf veränderte toxikologische Eigenschaften der Nanopartikel beziehen, gegebenenfalls kann so eine höhere Toxizität entstehen. Kommt der Mensch in Kontakt mit Nanopartikeln, können diese auf verschiedenen Wegen in den menschlichen Organismus gelangen. Inhaliert gelangen Nanopartikel bis in die Alveolen der Lunge und können von dort aus in den Blutkreislauf eintreten. Werden Nanopartikel oral aufgenommen, dann ist es möglich, dass sie im Magen-Darm-Trakt in die Lymphe oder in den Blutkreislauf übertreten. Über die intakte Haut konnte bisher keine Aufnahme von Nanopartikeln in den menschlichen Organismus nachgewiesen werden. Haben Nanopartikel es bis in den Blutkreislauf geschafft, dann können sie sogar die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Böhmert et al., 2017; Gzásó & Haslinger, 2014).

In der Medizin zeigen Nanopartikel großes Potential für das Drug Targeting. Unter Drug Targeting versteht man eine zielgerichtete selektive Medikamentenanreicherung und -wirkung in einem Zielorgan oder Zielgewebe, unabhängig davon wo und wie das Medi-

kament appliziert wurde. Idealerweise würde am Zielort eine hohe lokale Medikamentenkonzentration entstehen, während im restlichen Körper nur minimale Mengen des Medikaments nachweisbar wären, was auch die systemischen Nebenwirkungen des Medikaments reduzieren würde. Dies könnte einen entscheidenden Vorteil gegenüber der herkömmlichen systemischen Medikamentenapplikation darstellen, die an folgende Limitationen gebunden ist: gleichmäßige Verteilung des Medikaments über den gesamten Körper, fehlende Affinität des Medikaments zum gewünschten Wirkort, Notwendigkeit der Verabreichung hoher Dosen des Medikaments um am gewünschten Wirkort lokal ausreichend hohe Konzentrationen zu erreichen und unerwünschte Wirkungen des Medikaments durch die hohe Dosierung und Verteilung über den gesamten Körper. Beim Drug Targeting wird versucht diese Limitationen durch verschiedene Strategien zu umgehen. Die einfachste Methode eine lokale Medikamentenwirkung zu erreichen, ist die lokale Applikation des Medikaments. Dies ist jedoch nicht bei jeder Erkrankung durchführbar, sodass weitere Strategien benötigt werden, um auch bei einer intravenösen Gabe eines Medikaments eine lokale Anreicherung zu erzielen. Ein Ansatz nutzt die erhöhte Gefäßpermeabilität, welche in Tumoren, entzündetem Gewebe oder hypoxischen Arealen vorliegt. Medikamente, gebunden an eine Trägersubstanz, damit sie nicht vorzeitig abgebaut werden, können an solchen Stellen spontan aus den Gefäßen in das Interstitium austreten, dort akkumulieren, sich von ihrer Trägersubstanz lösen und ihre Wirkung lokal entfalten. Ein weiterer Ansatz macht sich abweichende Temperaturen und oder pH-Werte an bestimmten Zielorten zunutze. Dabei wird ein Medikament an eine Trägersubstanz gebunden, welche das Medikament nur an Orten mit einer bestimmten Temperatur und oder einem bestimmten pH-Wert frei gibt. Tumore und entzündete Gewebe weisen meist einen saureren pH-Wert und eine höhere Temperatur auf, als der restliche Körper und könnten daher als Zielort solcher Medikamente in Frage kommen. In einem anderen Ansatz werden Medikamente an ferromagnetische Trägersubstanzen gebunden. Nach intravenöser Gabe könnte die Verteilung des Medikaments durch ein extrakorporal angelegtes Magnetfeld gesteuert werden. Und zuletzt könnten Medikamente auch an bestimmte Moleküle gebunden werden, welche eine hohe Affinität für bestimmte Oberflächenantigene von Zellen in einem Zielgewebe besitzen und die Medikamente dorthin transportieren könnten (Torchilin, 2000).

Was die Nanopartikel für das Drug Targeting so interessant macht, ist ihre große reaktionsfreudige Oberfläche, an der Medikamente gut gebunden werden können. Je nach Art und Beschaffenheit der Bindung können die Nanopartikel das Medikament nur unter bestimmten Bedingungen, wie sie beispielsweise in einem Tumor oder in entzündetem Gewebe vorliegen, lokal abgeben. Die Medikamente entfalten dann ihre Wirkung haupt-

sächlich am Abgabeort und nicht im restlichen Körper. Dadurch könnten hohe Konzentrationen am Wirkort erzielt werden und gleichzeitig die systemischen Nebenwirkungen verringert werden. Zudem könnten auf Nanopartikel aufgeladene Medikamente in Räume vordringen, die vorher für sie unerreichbar waren. So könnten sie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke überwinden oder auch in eine Zelle oder sogar einen Zellkern eintreten. Am Zielort angekommen lösen sich die aufgeladenen Medikamente idealerweise von den Nanopartikeln und entfalten ihre Wirkung konzentriert an Ort und Stelle. Da die Verwendung der Nanopartikel als Trägersubstanz für Medikamente einen großen potentiellen Nutzen verspricht, bleibt die Frage zu klären, ob die Nanopartikel selbst sicher in der Anwendung sind oder ob sie für den Menschen ein gesundheitliches Risiko darstellen (De Jong & Borm, 2008).

In dieser Arbeit wurden die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid untersucht. Sie zeigen unter anderem als Trägersubstanzen für das Drug Targeting Potenzial und werden in den folgenden beiden Kapiteln vorgestellt.

## **1.2 Graphen Nanopartikel**

Graphen ist eine relativ neu entdeckte Substanz, die 2004 erstmals gezielt aus Graphit hergestellt wurde. Größeren Bekanntheitsgrad erlangte Graphen im Jahr 2010, als Andre Geim und Konstantin Novoselov den Nobelpreis für Physik für die Erforschung der Eigenschaften von Graphen verliehen bekamen. Graphen besteht aus Kohlenstoffatomen, die in einem zweidimensionalen Gitter hexagonal zueinander angeordnet sind. Graphen wird den Kristallen zugeordnet und ist der einzige bekannte zweidimensionale Kristall. Kohlenstoff (C) gehört neben Wasserstoff (H), Sauerstoff (O) und Stickstoff (N) zu den vier wichtigsten Elementen der belebten Natur, welche beim Menschen zusammengenommen etwa 96% der Körpermasse ausmachen. Diese vier Elemente werden daher auch Grundelemente genannt. Aber auch in anorganischer Materie ist Kohlenstoff vertreten. Gebunden in Molekülen ist Kohlenstoff beispielsweise als Bestandteil von Erdöl, Erdgas und Kohle anzutreffen. In reiner elementarer Form liegt Kohlenstoff als Graphit oder Diamant vor. Zur Herstellung von Graphen wird Graphit benötigt. Graphit besteht im Grunde aus Millionen von übereinandergeschichteten Graphen-Lagen, die durch relativ schwache Bindungen aneinandergelassen werden. Zieht man eine solche Lage vom Graphit ab, was im einfachsten Fall mit einem Klebeband geschieht, erhält man Graphen. Die meisten von uns werden Graphen bereits versehentlich hergestellt haben, ohne sich dessen überhaupt bewusst zu sein. Schreibt man mit einem Bleistift mit einer Graphit-Miene auf Papier, entsteht beim Abrieb des Graphits auch etwas Graphen. Mittlerweile gibt es verschiedene Möglichkeiten Graphen auch in größerem Maß-

stab industriell herzustellen. Was Graphen so besonders macht, ist seine hohe Flexibilität bei gleichzeitig enormer Reißfestigkeit. Zudem zeigt es einzigartige elektrische Eigenschaften, da sich Elektronen in Graphen fast ohne Widerstand mit enorm hohen Geschwindigkeiten bewegen können. Durch die besonderen Eigenschaften von Graphen ist eine Anwendung zur Herstellung von neuartigen Computer-Chips, transparenten Touchscreens oder Solarzellen, sowie zur Herstellung von Materialien, die sowohl leicht und elastisch als auch robust und widerstandsfähig sind, denkbar. Auf der Grundlage von Graphen können auch weitere neue Substanzen synthetisiert werden, von denen Graphenoxid (GO) zu den bekanntesten gehört. Graphenoxid ist im Gegensatz zu Graphen wasserlöslich (Geim & Novoselov, 2010; Müller-Esterl et al., 2018a; Novoselov et al., 2012; RÖMpp-Redaktion & Balgar, 2010).

In der Medizin bieten sich für Graphen Nanopartikel vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten (Hoseini-Ghahfarokhi et al., 2020). Graphen und seine Derivate wie Graphenoxid (oxidiertes Graphen) oder PEGyliertes Graphenoxid (mit Polyethylenglycol (PEG) konjugiertes Graphenoxid) zeigen großes Potential für das Drug Targeting. Aufgrund seiner zweidimensionalen, eine Atomlage dicken Struktur haben Graphen und seine Derivate sehr große Oberflächen im Vergleich zu ihrem Volumen und können bis zu 200% ihrer eigenen Masse an Medikamenten binden und transportieren. Zudem besitzt Graphen eine hohe chemische und mechanische Stabilität, wodurch Graphen verschiedensten Umweltbedingungen standhalten kann. Graphen ist einfach zu modifizieren und kann mit neuen funktionellen Gruppen versehen werden, durch die eventuell auch die Biokompatibilität von Graphen verbessert werden könnte (Wang et al., 2017).

So konnte beispielsweise Graphenoxid bereits erfolgreich mit Doxorubicin, einem in der Tumorthherapie verwendeten Medikament, beladen werden. Es zeigte sich, dass die Bindung zwischen Graphenoxid und Doxorubicin pH-abhängig ist und Doxorubicin vor allem bei sauren pH-Werten, wie sie auch in Tumorgewebe vorherrschen, wieder freigesetzt wird. Auf diese Weise könnte Doxorubicin gezielt in Tumorgewebe transportiert und dort freigesetzt werden (Depan et al., 2011).

Eine weitere für die Medizin interessante Eigenschaft von Graphen ist seine Fähigkeit zur Adsorption anderer Stoffe. Diese Eigenschaft machte es für die Aufbereitung von Abwasser hoch interessant (El-Maraghy et al., 2020). In den Abwässern der pharmazeutischen Industrie und in den Abwässern von Krankenhäusern fallen Antibiotika an, welche Gefahren für Mensch und Umwelt darstellen. Eines der größten Probleme dabei ist die Entstehung neuer Antibiotikaresistenzen (Kümmerer, 2003). Um dem vorzubeugen, sind neue Ansätze gefragt, um Antibiotika aus Abwässern zu entfernen. Graphenoxid



beispielsweise, zeigt Potential Levofloxacin aus Abwässern heraus zu filtern. Dafür wurden hauchdünne Graphenoxid-Blätter mit einer Stärke von 5 nm verwendet (El-Maraghy et al., 2020).

Doch das vielseitige Material Graphen hat noch ganzandere Anwendungsmöglichkeiten. So sind unter anderem Graphen enthaltende Kontaktlinsen mit verschiedensten Anwendungsmöglichkeiten in Entwicklung. Der Vorteil von Graphen besteht hierbei unter anderem in seiner Transparenz, welche für Kontaktlinsen von entscheidender Bedeutung ist (Dennyson Savariraj et al., 2021). Es sind Kontaktlinsen in der Forschung, welche mittels auf Graphen basierenden Strukturen den intraokulären Druck und auch den Blutzucker messen können (Kim et al., 2017). Zudem sind Kontaktlinsen zur okulären Medikamentenapplikation in Entwicklung. Der Vorteil gegenüber Augentropfen besteht in einer konstanten und länger andauernden Medikamentenabgabe ins Auge. Dabei wurden Kontaktlinsen entwickelt, bei denen Graphenoxid als Trägersubstanz für das Antimykotikum Voriconazol verwendet wird, zur Behandlung von Pilzinfektionen der Augen (Huang et al., 2016).

### **1.3 Siliciumdioxid Nanopartikel**

Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) ist ein Oxid des Siliciums. Elementares Silicium (Si) gehört zu den Halbmetallen und ist in der vierten Hauptgruppe des Periodensystems zu finden. Mit einem Anteil an der Erdkruste von etwa 26,3% ist Silicium nach Sauerstoff das am zweithäufigsten vorkommende Element auf der Erde. Der Großteil des Siliciums ist in anorganischen Materialien enthalten und nur in Spuren in pflanzlichen oder tierischen Organismen vertreten. Dabei stellt Siliciumdioxid als das wichtigste Oxid des Siliciums, die häufigste anorganische Verbindung der Erde dar. Der aus kristallinem Siliciumdioxid bestehende Quarz ist Hauptbestandteil von Sand und Bestandteil von Gesteinen wie Granit und Sandstein. Dabei kommen Quarz-Sandkörner sogar im Nanomaßstab natürlich vor. Opale bestehen aus amorphem nicht-kristallinem Siliciumdioxid. Für den Menschen zählt Silicium zu den Spurenelementen, zu Elementen die jeweils weniger als 0,01% der Biomasse eines Menschen ausmachen. Bisher konnte nicht nachgewiesen werden, ob Silicium essenziell für den menschlichen Organismus ist, jedoch wird Silicium und auch Siliciumdioxid als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt (Krug & Hartmann-Schreier, 2016; Müller-Esterl et al., 2018a; Sitzmann et al., 2020).

In der Medizin ist Siliciumdioxid vor allem in Zusammenhang mit der Silikose bekannt. Durch das Einatmen von Quarzstaub, bestehend aus kristallinem Siliciumdioxid, kommt es in der Lunge zu einer Entzündungsreaktion und infolgedessen zur einer Lungenfibrose. Dabei sind nur Quarz-Partikel kleiner 5  $\mu\text{m}$  (Feinstaub) relevant, da sie klein

genug sind, um bis in die Alveolen vorzudringen. Die Silikose ist in erster Linie eine Berufskrankheit. Betroffen sind vor allem die Glas-, Keramik-, Metall-, Porzellan- und Steinbruchindustrie. Präventiv können Schutzmasken getragen werden (Herold & Mitarbeiter, 2020). Auch Siliciumdioxid Nanopartikel können aufgrund ihrer Größe bis in die Alveolen der Lunge gelangen.

Dahingegen wurde das amorphe Siliciumdioxid als unbedenklich eingestuft und findet Verwendung als Zusatz in Kosmetika, Kunststoffen, Gummi, Farben, Klebstoffen, Lacken und Autoreifen. Zudem sind amorphe Siliciumdioxid Nanopartikel als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen (DaNa, o.J.-a).

In der Medizin zeigen Siliciumdioxid Nanopartikel Potenzial für das Drug Targeting. Dabei scheinen vor allem mesoporöse (mit einem Porendurchmesser von 2 nm bis 50 nm (Chemie.de, o.J.)) Silicium Nanopartikel aufgrund ihrer Poren-Struktur besonders gut geeignet zu sein (She et al., 2018).

Ein potenzielles Anwendungsgebiet liegt in der Lokalanästhesie. Es wird an Silicium Nanopartikeln als Träger für Tetrodotoxin, einem Lokalanästhetikum mit hohem Nebenwirkungspotential bei höherer Dosierung, geforscht. Tetrodotoxin ist hydrophil und kann daher auf Lipiden basierende Membrane im Körper nicht überwinden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Silicium Nanopartikel Tetrodotoxin binden und bei Injektion in Mäuse in deren periphere Nerven transportieren können. Dadurch kann eine höhere lokale Wirkung bei gleichzeitig geringerer Dosis und somit eine Vermeidung der Nebenwirkungen durch das Anästhetikum erreicht werden. Auch andere Lokalanästhetika könnten auf diese Weise verabreicht werden (Liu et al., 2018). In einer anderen Arbeit wurden THC und ARA290, welche analgetisch und antiphlogistisch wirken, an mesoporöse Silicium Nanopartikel gekoppelt und in entzündetes Gewebe injiziert. Dort konnte eine lokale Freisetzung und Wirkung der Substanzen beobachtet werden. Dies könnte neue Möglichkeiten in der Therapie neuropathischer Schmerzen schaffen (Xie et al., 2016).

Aber auch in der Onkologie gibt es vielversprechende Ansätze mit mesoporösen Silicium Nanopartikeln (Zhang et al., 2017). So wurden beispielsweise mesoporöse Silicium Nanopartikel an Antikörper, welche gegen ein bestimmtes Tumorantigen gerichtet sind, gebunden. Anschließend wurden die Nanopartikel mit Doxorubicin beladen. Diese Verbindung wurde Mäusen venös verabreicht und reichte sich aufgrund des Antikörpers an Tumorzellen mit dem entsprechenden Antigen an. Dort kam es dann zur Redox-abhängigen Freisetzung von Doxorubicin aus den Silicium Nanopartikeln. Ein Ansatz der durch die zusätzliche Kopplung an den Antikörper eine hohe Zielgenauigkeit der Medikamentenapplikation verspricht (Chen et al., 2020).

#### **1.4 Zellzyklus, Apoptose und Nekrose**

Da in dieser Arbeit mit Zellkulturen gearbeitet und toxikologische Untersuchungen durchgeführt wurden, wird an dieser Stelle auf den Zellzyklus und die Mechanismen des Zelltods eingegangen. Der Zellzyklus lässt sich in vier Phasen einteilen: G1-Phase (Gap 1), S-Phase (Synthese), G2-Phase (Gap 2) und M-Phase (Mitose). Die G1-Phase, S-Phase und G2-Phase werden zusammen auch als Interphase bezeichnet. In der G1-Phase wächst die Zelle und synthetisiert Proteine. Ist die Zelle ausreichend gewachsen, befindet sich noch freier Platz neben der Zelle und wird sie durch Wachstumsfaktoren stimuliert, tritt sie in die nächste Phase des Zellzyklus ein. Dafür muss sie allerdings einen Kontrollpunkt überwinden, den sogenannten G1/S-Restriktionspunkt. Hier wird überprüft, ob die Desoxyribonukleinsäure (DNA) intakt ist. Nur wenn keine DNA-Schäden vorliegen, kann die Zelle in die S-Phase eintreten. In der S-Phase wird nun die DNA verdoppelt, um später gleichmäßig auf die zwei entstehenden Tochterzellen aufgeteilt werden zu können. Im Anschluss tritt die Zelle in die G2-Phase ein, in der sie sich auf die Zellteilung vorbereitet und alle dafür benötigten Proteine synthetisiert. Am Ende der G2-Phase muss erneut ein Kontrollpunkt überwunden werden, der G2/M-Restriktionspunkt, bei dem die Vollständigkeit und Fehlerlosigkeit der DNA-Replikation überprüft wird. Werden Fehler entdeckt, hat die Zelle jetzt noch die Möglichkeit diese zu beheben. Anschließend tritt die Zelle in die M-Phase ein. In der M-Phase erfolgt mit der Mitose die Aufteilung in zwei Tochterzellen. Die Mitose wird noch weiter unterteilt in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Hierbei gibt es einen weiteren Kontrollpunkt, bei dem überprüft wird, ob sich die Chromosomensätze in der Mitosespindel korrekt aufgeteilt haben. Sobald die Teilung abgeschossen ist, starten die Tochterzellen selbst wieder mit der G1-Phase. Manche Zellen verlassen allerdings die G1-Phase nicht mehr und hören auf sich zu teilen. Sie sind enddifferenziert und kommen ihrer jeweiligen Funktion für den Gesamtorganismus nach. In diesem Fall spricht man von einer G0-Phase. Doch keine Zelle lebt ewig und irgendwann tritt bei einer jeden der Tod ein. Dies kann über zwei verschiedene Mechanismen geschehen. Zellen können durch Nekrose oder durch Apoptose sterben. Unter Nekrose versteht man den Tod der Zelle aufgrund einer Funktionsstörung durch eine Läsion. Die Läsion stört das osmotische Gleichgewicht der Zelle, diese schwillt an und platzt. Es bleiben Zelltrümmer zurück. Die dabei freigesetzten Enzyme lösen eine Entzündungsreaktion aus und locken Makrophagen an, welche die Überreste der Zelle phagozytieren. Die Nekrose kann man auch als unfreiwilligen Tod der Zelle bezeichnen, der durch Verletzung verursacht wird. Dahingegen wird die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, zielgerichtet ausgelöst, um nicht mehr benötigte Zellen oder Zellen mit beschädigter DNA zu entfernen. So können beispielsweise alte Blutzellen ausgemustert werden oder mutierte Zellen zum Schutz

des restlichen Organismus beseitigt werden. Dabei zersetzt sich der Zellkern, die Zelle schrumpft und teilt sich in freie Vesikel mit intakter Zellmembran auf, welche durch Makrophagen phagozytiert werden können. Somit werden keine Zellinhalte freigesetzt und deshalb wird auch keine Entzündungsreaktion ausgelöst. Am Vorgang der Apoptose sind unter anderem die beiden Proteine Bax und Caspase-3 beteiligt, die an dieser Stelle hervorgehoben werden, da sie im Rahmen dieser Arbeit als Apoptose-Marker bestimmt wurden. Die Apoptose kann von der Zelle selbst über den intrinsischen Apoptoseweg oder durch externe Signale über den extrinsischen Apoptoseweg eingeleitet werden. Der intrinsische Apoptoseweg wird unter anderem durch von der Zelle festgestellte irreparable Schäden ihrer eigenen DNA eingeleitet. Es kommt zum Anstieg des Tumorsuppressors p53. Durch p53 wird die Expression des Bax Gens induziert, infolgedessen kommt es zum Anstieg des Bax Proteins. Normalerweise liegt Bax als proapoptotisches Protein zusammen mit Bcl-2 als antiapoptotisches Protein in Homöostase in der äußeren Mitochondrienmembran vor. Durch die Hochregulation von Bax überwiegen die proapoptotischen Signale. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Ins Zytosol freigesetzt bewirkt Cytochrom c eine Aktivierung von Caspase-9, welche daraufhin Caspase-3 aktiviert, welche schlussendlich die Apoptose auslöst. Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Bindung von Liganden an die in der Zellmembran sitzenden Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren) eingeleitet, kann aber auch durch den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden. Dies löst eine Kette an Reaktionen aus, die schließlich ebenfalls in einer Caspasen-Kaskade unter anderem mit der Aktivierung von Caspase-3 gipfelt. Somit hat jede Zelle, falls sie nicht durch Nekrose stirbt, in ihrem Leben immer drei Möglichkeiten: die Zelle kann bleiben wie sie ist und in die G<sub>0</sub>-Phase eintreten, die Zelle kann den Zellzyklus durchlaufen und sich teilen oder die Zelle stirbt gewollt durch Apoptose (Arnemann, 2019; Boujard et al., 2014; Horn, 2012; Müller-Esterl et al., 2018b).

### **1.5 Ziel dieser Arbeit**

Nanopartikel sind aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten Gegenstand eines stetig wachsenden Forschungszweigs. In der Medizin liegt ihr potenzieller Nutzen unter anderem im Drug Targeting, der zielgerichteten Anreicherung und Wirkung eines Medikaments an einem bestimmten Zielort, unabhängig von seinem Applikationsort. Hierfür sind unter anderem Graphen und Siliciumdioxid Nanopartikel als Trägersubstanz für Medikamente von Interesse. Jedoch muss, bevor die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid in der Medizin eingesetzt werden können, zunächst ihre Verträglichkeit überprüft werden. Durch eine intravenöse Verabreichung könnten hohe Konzentrationen der Nanopartikel im menschlichen Körper entstehen und sie könnten Kontakt zu Zellen erhalten, die auf natürlichem Weg noch keinen Nanopartikeln ausgesetzt waren. Bisher

traten Nanopartikel vor allem durch Inhalation in Kontakt mit Lungenzellen und bei oraler Aufnahme in Kontakt mit Zellen des Magen-Darm-Traktes. Doch bei intravenöser Gabe könnten die Nanopartikel in Kontakt mit vielen weiteren menschlichen Zelltypen treten, allen voran den Endothel-, Leber- und Nierenzellen. Auch vor dem Hintergrund einer zunehmenden Exposition des Menschen mit Nanopartikeln durch zunehmende Anwendung in der Industrie, ist eine toxikologische Untersuchung der Nanopartikel dringend nötig.

Das Ziel dieser Arbeit ist eine toxikologische Untersuchung der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid im Zellmodell. Dabei wurden Graphen Nanopartikel mit einer Dicke von 6 bis 8 nm und einer Breite von 15 µm verwendet. Die verwendeten Siliciumdioxid Nanopartikel waren kugelförmig und porös mit einer Partikel-Größe von 5 bis 20 nm. Es soll die dosisabhängige Toxizität gegenüber verschiedenen Zelllinien geprüft werden, wobei Zellviabilitätstests zum Einsatz kommen. Zudem soll an den Zelllinien geprüft werden, ob die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid eine Apoptose einleiten. Dafür werden die beiden Apoptose-Marker Bax und Caspase-3 herangezogen und ihre Expression auf Gen- und Proteinebene bestimmt. Um verschiedene Gewebetypen in den Untersuchungen abdecken zu können, wurden Endothel-, Darm-, Leber-, Nieren- und Lungenzellen ausgewählt. Damit soll diese Arbeit einen Beitrag zur Untersuchung der Toxizität der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

*Tabelle 1: Geräte*

Gerät	Modell/Typ	Hersteller
Abzug	2-453-DAHD	Köttermann, Uetze, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Heizplatte	Dri-Block DB 2A	Techne, Stone, UK
Imager	FluorChem FC2	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Inkubator	Steri-Cult 200 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plattenleser 1	Tecan genios pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Netzgerät Elektro- phorese	PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Feldkir- chen, Deutschland
Netzgerät Tankblot	E835	Consort, Turnhout, Belgien
Plattenleser 2	Tecan sunrise	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
RT-PCR Gerät	StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, USA
Rüttelplatte	IKA-VIBRAX-VXR	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
Sterile Werkbank	Herasafe (HS 15)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tankblot	peqlab PerfectBlue	VWR International, Radnor USA
Thermocycler	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Waltham, USA
Ultraschall-Homo- genisator	Sonoplus UW 3080	Bandelin, Berlin, Deutschland
Waage	Excellence XA105DU	Mettler Toledo, Columbus, USA
Wärmeplatte	OTS 40.3040	Medite, Burgdorf, Deutschland
Wasserbad	Wasserbad 1083	LAUDA-GFL, Lauda-Kö- nigshofen, Deutschland
Zentrifuge 1	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 Universalz- entrifuge	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
Zentrifuge 2	Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg, Deuts- chland

*Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien*

Material	Hersteller	Referenznummer
6-Well-Platten	Thermo Fischer Scientific, Wal- tham, USA	140675
96-Well-Platten	Thermo Fischer Scientific, Wal- tham, USA	167008
Falkon Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	188271
Falkon Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	227261

Kanüle, 0,3 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	304000
Kanüle, 0,5 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	300600
Kryoröhrchen	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	5000-0020
Parafilm Folie	Bemis, Neenah, USA	PM-996
PCR-96-Well-Platte	Applied Biosystems, Waltham, USA	4483487
PCR-Folie	Applied Biosystems, Waltham, USA	4311971
Petrischale, groß (Durchmesser: 100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3902
Petrischale, klein (Durchmesser: 60 mm)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	628160
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland	1620177
Reaktionsgefäß, 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	711080
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Dutschland	72.706
Reaktionsgefäß, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Dutschland	72.695.500
Reaktionsgefäß, 5 ml, schwarz	Starlab, Hamburg, Deutschland	E1450-1108
Spritze, 1ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland	9161309V
Weiße 96-Well-Platte (OptiPlate-96)	PerkinElmer, Waltham, USA	P12-106
Zellkulturflasche T25 (Wachstumsfläche: 25 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	690175
Zellkulturflasche T75 (Wachstumsfläche: 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	658175
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3951

Tabelle 3: Medien, Zusätze und Substanzen für die Zellkultur

Medium/Zusatz/Substanz	Hersteller	Referenznummer
DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D5796
DMEM farblos	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D1145
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D2650
EMEM	ATCC, Manassas, USA	30-2003
FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F7524
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G2500
L-Glutamine	Biochrom, Berlin, Deutschland	K0283
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D8662
PBS (ohne Mg <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D8537
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland	A2213
RPMI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R8758
RPMI farblos	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R7509
Trypsin	Biochrom, Berlin, Deutschland	L2143

Tabelle 4: Kits

Kit	Hersteller	Referenznummer
EZ4U	Biomedica, Wien, Österreich	BI-5000
CellTiter-Glo 2.0 Assay	Promega, Madison, USA	G9242
Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH)	Roche, Basel, Schweiz	4744934001
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740955.250
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	4368814
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	23225



Tabelle 5: RT-qPCR Sonden

TaqMan Sonde	Hersteller	ID
Bax, human	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	Hs00180269_m1
Bax, mouse	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	Mm00432051_m1
CANX, human	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	Hs01558409_m1
CANX, mouse	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	Mm00500330_m1
Caspase-3, human	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	Hs00234387_m1
Caspase-3, mouse	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	Mm01195085_m1

Tabelle 6: Western Blot Antikörper

Antikörper	Hersteller	Referenznummer
Anit-Caspase-3	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	9662
Bax Antibody	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	2772
Anti-β-Aktin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A3854
Anti-Rabbit IgG	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	7074

Tabelle 7: Sonstige Substanzen

Substanz	Hersteller	Referenznummer
3-Aminophthalhydrazide (Luminol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	123072
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	A3678
Aqua dest.	B.Braun, Melsungen, Deutschland	0082479E
Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B0126
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	A7906
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G5516
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	131340
Graphen Nanopartikel	TCI, Tokyo, Japan	G0442
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	I9516
Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	32213
Milchpulver (Nonfat dried milk powder)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A0830
MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M2128

Nuclease-freies Wasser	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	AM9937
PageRuler	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	26619
PBS (ohne Mg <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> )	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D8537
p-Coumaric-Acid (PCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C9008
Pick-Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Basel, Schweiz	5892970001
RNase AWAY	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	83931
Rotiophorese Gel	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	3029.2
Siliciumdioxid Nanopartikel	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	637246
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A1112
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	M6250
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA	4444557
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T9281
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	3029.3
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P7949
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	216763

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien

Es wurden fünf verschiedenen Zelllinien kultiviert. Die cerebEND Zellen entstammen cerebellären Endothelzellen der Maus (Burek et al., 2012). Die Caco-2 Zellen sind Epithelzellen des Colons und entstammen vom Menschen. Sie wurden aus einem Kolorektalen Adenokarzinom isoliert (ATCC, o.J.-b). Die Hep G2 Zellen sind ebenfalls humanen Ursprungs. Es handelt sich um epithelähnliche Leberzellen, die aus einem Hepatozellulären Karzinom isoliert wurden (ATCC, o.J.-c). Die HEK-293 Zellen entstammen humanen embryonalen Nierenepithelzellen (ATCC, o.J.-a). Die H441 Zellen sind humane Lungenepithelzellen und entstammen einem papillären Adenokarzinom der Lunge (ATCC, o.J.-d). Die folgende Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Zelllinien.

Tabelle 8: Zelllinien im Überblick

Zelllinie	Ursprung	Gewebe
cerebEND	Maus	Zerebrale Endothelzellen
Caco-2	Mensch	Kolonzellen
Hep G2	Mensch	Leberzellen
HEK-293	Mensch	Nierenzellen
H441	Mensch	Lungenzellen

### 2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup>) im Inkubator bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Dabei erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Zellkulturmediums (Basismedium mit Zusätzen) alle zwei bis drei Tage. Nach ausreichendem Wachstum, welches regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert wurde, wurden die Zellen alle sieben Tage in definiertem Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen oder auf Versuchsplatten aufgeteilt. Dieser Vorgang wird Passagieren genannt. Die Anzahl der Passagen wurde dabei fortlaufend gezählt und dokumentiert. Alle Arbeiten an den Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen an der sterilen Werkbank. Dabei wurden die Arbeitsflächen sowie alle unter der Werkbank benutzten Behältnisse und Pipetten vor und nach Anwendung mit 70%igem Ethanol gereinigt und wischdesinfiziert. Die Zellkulturflaschen wurden bei Arbeiten unter der sterilen Werkbank auf eine Wärmeplatte gestellt, welche auf 37°C erhitzt wurde, um ein Auskühlen zu vermeiden.

Die Ernährung der Zellen erfolgte mit dem entsprechenden Basismedium für die Zelllinie, mit den Zusätzen Fetales Kälberserum (FCS), zur Versorgung mit Wachstumsfaktoren, und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (PS), zur Prävention von bakteriellen Kontaminationen. Das im Kühlschrank gelagerte Basismedium, sowie die im Gefrierfach bei -20°C gelagerten Zusätze mussten zuerst im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Nach der Erwärmung wurden zu einer Flasche mit 500 ml Medium unter sterilen Bedingungen 50 ml (entspricht 10%) FCS und 5 ml (entspricht 1 %) PS dazugegeben. Nach ausgiebigem Schwenken zur Durchmischung der Komponenten, war das Zellkulturmedium fertig zum Gebrauch. Nicht benötigtes Zellkulturmedium mit Zusätzen wurde im Kühlschrank gelagert. Um das Zellkulturmedium einer T75 Zellkulturflasche zu wechseln, wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und durch 15 ml erwärmtes Zellkulturmedium ersetzt. Bei der gelegentlich verwendeten kleineren T25 Zellkulturflasche (Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup>) wurden nur 5 ml Zellkulturmedium benötigt.

Sobald die Zellen nach sieben Tagen Wachstum in der Zellkulturflasche einen dichten Zellrasen auf dem Boden gebildet hatten, war es Zeit für eine neue Passage. Bei den Zelllinien cerebEND und HEK-293 war eine vorherige Beschichtung der neuen Zellkulturflaschen mit Gelatine notwendig. Dafür wurden bei einer T75 Zellkulturflasche 10 ml einer 0,5%igen Gelatine-Lösung und bei einer T25 Zellkulturflasche 5 ml der 0,5%igen Gelatine-Lösung in die neue Flasche pipettiert und auf dem Boden gleichmäßig verteilt. Zur Erhärtung der Gelatine wurden die Flaschen dann 30 min stehen gelassen. War nach dieser Zeit noch ein flüssiger Gelatine-Überstand vorhanden, wurde dieser abgesaugt. Damit war die Flasche bereit, um Zellen aufzunehmen. Das Zellkulturmedium wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das im Gefrierfach bei -20°C gelagerte Trypsin musste ebenfalls im Wasserbad erwärmt werden. Nun konnte das Zellkulturmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt werden. Die Zellkultur wurde zwei Mal mit Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium gespült. PBS wurde nicht erwärmt und hatte Raumtemperatur. Im Anschluss wurde das aufgewärmte Trypsin auf die Zellen gegeben. Bei einer T75 Flasche wurden 4 ml, bei einer T25 Flasche 1 ml Trypsin benötigt. Die Zellkulturflasche wurde nun auf die Wärmeplatte unter der sterilen Werkbank gestellt, um die Aktivität des Trypsins zu steigern. Dabei wurde die Flasche immer wieder leicht geschwenkt. Unter dem Mikroskop konnte beurteilt werden, ob sich die Zellkontakte durch Trypsin schon gelöst hatten und die Zellen frei im Trypsin schwammen. Dies dauerte je nach Zelllinie unterschiedlich lange. Die HEK-293 Zellen lösten sich bereits sehr schnell, wohingegen sich die Caco-2 und die Hep G2 Zellen schwerer ablösen ließen. Dabei muss man aufpassen die Zellen nicht zu lange dem Trypsin auszusetzen, da es sonst zur Lyse der Zellen kommen kann. Nachdem sich die Zellen einzeln vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurde aufgewärmtes Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen wurden je nach ihrem Teilungsverhältnis auf neue Zellkulturflaschen oder auf Versuchsplatten verteilt. Dabei wurden zu den Zellen in den T75 Flaschen 15 ml Zellkulturmedium und zu den Zellen in den T25 Flaschen 5 ml Zellkulturmedium gegeben. Die neue Zellkulturflasche wurde mit der Zelllinie und der aktuellen Passagezahl beschriftet und in den Inkubator gestellt. Die im Medium schwimmenden Zellen setzten sich auf dem Boden der Zellkulturflasche ab und wuchsen dort erneut heran. Die folgende Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Eckdaten zur Kultivierung der einzelnen Zelllinien.

Tabelle 9: Kultivierung der Zellen

Zelllinie	Basismedium	Zusätze zum Medium	Zellaussaat
cerebEND	DMEM	FCS und PS	1:3
Caco-2	DMEM	FCS und PS	1:20
Hep G2	RPMI	FCS und PS	1:5
HEK-293	EMEM	FCS und PS	1:20
H441	RPMI	FCS und PS	1:5

### 2.2.3 Kryokonservierung der Zellen

Bei jeder Passage konnten nicht benötigte Zellen zur Aufbewahrung kryokonserviert werden. Der benötigte Einfrierpuffer für ein 1 ml fassendes Kryoröhrchen setzte sich wie folgt zusammen: 0,8 ml Zellkulturmedium, 0,1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 0,1 ml FCS. Der Einfrierpuffer wurde entsprechend der Anzahl an gewünschten Kryoröhrchen angesetzt. Die Zellen wurden von der T75 Zellkulturflasche in ihrem gewohnten Verhältnis, jedoch maximal in einem Verhältnis von 1:5 auf die Kryoröhrchen aufgeteilt. Die nach der Passage im Zellkulturmedium gelösten Zellen wurden bei Raumtemperatur und 100 g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Zellkulturmedium vom Zell-Pellet abgesaugt und der Einfrierpuffer hinzugegeben. Die Zellen wurden mit dem Einfrierpuffer durchmischt, auf die Kryoröhrchen verteilt und über Nacht zum langsamen Einfrieren in einem Isolierbehälter in ein -80°C Gefrierfach gestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff gebracht.

### 2.2.4 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Stickstoff-Tank entnommen und innerhalb von zwei Minuten in ihrem Kryoröhrchen im Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C aufgetaut. Daraufhin wurden die Zellen in eine vorbereitete T25 Zellkulturflasche pipetiert. Diese enthielt 5 ml erwärmtes Zellkulturmedium und war je nach Zelllinie mit Gelatine beschichtete. Nach acht Stunden oder am Folgetag erfolgte der erste Wechsel des Zellkulturmediums. Am zweiten Tag nach dem Auftauen wurden die Zellen wie bei der Passage gelöst und ohne Aufteilung in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Von nun an wurde, wie im Kapitel 2.2.2 Kultivierung der Zellen beschrieben, weiter vorgegangen.

### 2.3 Substanzen in Suspension mit Medium bringen

Die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid wurden für Versuche mit dem zur Zelllinie gehörigem Basismedium in Suspension gebracht. Verwendet wurden Graphen Nanopartikel mit einer Dicke von 6 bis 8 nm und einer Breite von 15 µm und kugelförmig, porös Siliciumdioxid Nanopartikel mit einer Partikel-Größe von 5 bis 20 nm. Die Nano-

partikel wurden jeweils in einem Reaktionsgefäß abgewogen. Zu 10 Teilen abgewogenen Nanopartikeln wurde 1 Teil Basismedium bzw. farbloses Basismedium gegeben um eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml herzustellen. Je nach benötigter Menge wurde ein 2 ml oder ein 5 ml Reaktionsgefäß verwendet. Zur Durchmischung wurden die Reaktionsgefäße gevortext. Die Stocklösungen wurde sogleich zur Herstellung der Konzentrationsreihen verwendet. Dabei wurden die drei folgenden Konzentrationen hergestellt: 1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml (siehe Tabelle 10). Diese Konzentrationen wurden durch die Vorversuche nach Austestung mehrerer Konzentrationen ausgewählt. Wenn die Suspension auf 96-Well-Platten gegeben werden sollte, wurden die Konzentrationsreihen in Petrischalen angesetzt, von wo sie mit einer Mehrkanalpipette aufgenommen werden konnten. Sollten die Suspensionen auf 6-Well-Platten gegeben werden, wurden die Konzentrationsreihen je nach benötigter Menge in 15 ml oder 50 ml Reagenzröhrchen angesetzt und von dort auf die 6-Well-Platten pipettiert. Die Zellen wurden in allen Versuchen für 24 Stunden den Suspensionen mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid in den drei verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt.

*Tabelle 10: Konzentrationen der Nanopartikel*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Konzentration</b>
Konzentration 1 (c1)	0,01 mg/ml
Konzentration 2 (c2)	0,1 mg/ml
Konzentration 3 (c3)	1 mg/ml

## **2.4 Zellviabilität**

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit der Suspension aus Basismedium und Nanopartikeln wurden EZ4U, CellTiter-Glo Assay, MTT-Test und LDH-Test durchgeführt. Die letzten beiden Versuche wurden nach einer Austestung im Rahmen der Vorversuche wieder verlassen. Allen Versuchen gemeinsam war die Anzucht der Zellen und Inkubation der Nanopartikel auf durchsichtigen 96-Well-Platten.

### **2.4.1 Zellkultivierung und Inkubation der Substanzen auf 96-Well-Platten**

Eine 96-Well-Platte besteht aus 12 Spalten, welche von 1 bis 12 durchnummeriert sind, und 8 Reihen, welche mit A bis H bezeichnet werden. Nachdem die Zellen eine Woche in der T75 Zellkulturflasche heranwuchsen, wurden sie auf 96-Well-Platten ausgesät. Die cerebEND Zellen wurden für den EZ4U Test und den CellTiter-Glo Assay im Verhältnis 1:6 geteilt, für den MTT und den LDH-Test im gewohnten Verhältnis 1:3. Die Caco-2 und die HEK-293 Zellen wurden in ihrem gewohnten Verhältnis von 1:20 ausgesät. Bei den Caco-2 und HEK-293 Zellen bildeten sich beim Ablösen der Zellen mit Trypsin kleine Zellklumpen. Um trotzdem eine möglichst gleichmäßige Verteilung der

Zellen auf die Wells zu erreichen, wurden die Caco-2 und HEK-293 Zellen durch einen 40 µm Zell-Filter filtriert, bevor sie auf die 96-Well-Platten ausgesät wurden. Die Hep G2 und H441 Zellen wurden für den EZ4U-Test und den CellTiter-Glo Assay im Verhältnis 1:10 ausgesät. Die im Zellkulturmedium gelösten Zellen wurden in eine Petrischale gegeben und mit einer Mehrkanalpipette unter konstanter Durchmischung auf die 96-Well-Platte pipettiert. Dabei wurde jedes Well der Platte mit 200 µl befüllt, mit Ausnahme der letzten Spalte mit der Ziffer 12, welche nur mit Zellkulturmedium ohne Zellen gefüllt wurde. Anschließend kam die 96-Well-Platte in den Inkubator. Alle zwei bis drei Tage wurde bei den Spalten 1 bis 11 das Zellkulturmedium gewechselt. Dafür wurde zunächst das Zellkulturmedium aus dem Kühlschrank im Wasserbad auf 37°C erwärmt und dann in eine Petrischale gegeben. Im Anschluss wurde das alte Zellkulturmedium aus den einzelnen Wells abgesaugt bzw. bei der Zelllinie Hep G2 abpipettiert, da durch das Absaugen ein Zellverlust entstand. Danach wurden mit der Mehrkanalpipette 200 µl des neuen Zellkulturmediums pro Well pipettiert.

Bei den Zelllinien cerebEND und HEK-293 wurden die 96-Well-Platten zuvor mit 0,5%iger Gelatinelösung beschichtet, analog zur Beschichtung der Zellkulturflaschen. Dafür wurde die Gelatinelösung in eine Petrischale gegeben. Mit der Mehrkanalpipette wurden daraufhin 50 µl 0,5%ige Gelatinelösung pro Well pipettiert. Nachdem die Gelatine 30 min aushärten konnte, wurde der Überstand abgesaugt und die Platte war bereit, um Zellen aufzunehmen.

Nachdem die Zellen fünf Tage (EZ4U, LDH) bzw. sieben Tage (MTT, CellTiter-Glo Assay) in den 96-Well-Platten herangewachsen waren, konnten die Substanzen zur 24-stündigen Inkubation auf die Platten gegeben werden. Zunächst wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt bzw. abpipettiert. Daraufhin wurde die Platte zweimal mit im Wasserbad auf 37°C erwärmten PBS gespült, dabei wurden pro Well 200µl PBS gegeben und im Anschluss wieder abgesaugt bzw. abpipettiert. Im Anschluss kamen die Substanzen zur Inkubation auf die Platte. Die Spalten 1 und 2 wurden mit Basismedium mit 10% DMSO als Negativkontrolle gefüllt. In die Spalten 3 und 4 kam Basismedium als Kontrolle. Graphen wurde als Suspension in aufsteigender Konzentration in die Spalten 5 bis 7 gegeben, Siliciumdioxid in die Spalten 8 bis 10. In die Spalte 11 wurde Basismedium mit 10% FCS als Positivkontrolle gegeben. Jedes Well wurde dabei jeweils mit 200 µl befüllt. In der Spalte 12 befanden sich keine Zellen, das darin befindende Basismedium wurde belassen. Die Einteilung der 96-Well-Platte ist in Tabelle 11 nochmals aufgeführt. Nachdem die Substanzen auf die Platte gebracht wurden und die Spalten beschriftet waren, wurde die 96-Well-Platte zur 24-stündigen Inkubation in den Inkubator gestellt. Am Folgetag wurden die Versuche wie in den folgenden Kapiteln durchgeführt.

Tabelle 11: Inkubation der 96-Well-Platte

Spalte	Zellen	Substanz	Funktion
1 und 2	Ja	10% DMSO	Negativkontrolle
3 und 4	Ja	Basismedium	Kontrolle
5	Ja	Graphen c1	Nanopartikel
6	Ja	Graphen c2	Nanopartikel
7	Ja	Graphen c3	Nanopartikel
8	Ja	Siliciumdioxid c1	Nanopartikel
9	Ja	Siliciumdioxid c2	Nanopartikel
10	Ja	Siliciumdioxid c3	Nanopartikel
11	Ja	10% FCS	Positivkontrolle
12	Nein	Basismedium	Blank

#### 2.4.2 EZ4U-Test

Im EZ4U Kit sind mehrere Substrat-Fläschchen, welche jeweils für eine 96-Well-Platte ausreichen, und ein Aktivator-Fläschchen, welches für mehrere Platten verwendet werden kann. Das Kit wurde im Kühlschrank gelagert. In ein Substrat-Fläschchen wurden 2,5 ml vom Aktivator pipettiert. Es entstand eine gelbe Lösung. Nach abgelaufener 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen auf der 96-Well-Platte zweimal mit im Wasserbad auf 37°C erwärmten PBS gespült, um Ablagerungen von Graphen und Siliciumdioxid zu entfernen, welche die spätere Messung der Adsorption stören konnten. Dadurch konnten die Ablagerungen allerdings nicht restlos entfernt werden. Bei den Zelllinien HEK-293 wurde auf ein Spülen mit PBS verzichtet, da die Zellen sich dabei abgelöst hatten. Deshalb wurden die HEK-293 Zellen in farblosem Medium inkubiert. Die 2,5 ml der hergestellten EZ4U-Lösung wurden in einer Petrischale zu 25 ml farblosem Basismedium der entsprechenden Zelllinie gegeben und mit der Mehrkanalpipette durchmischt. Davon wurden nach dem Spülen mit PBS 220 µl pro Well pipettiert. Das entspricht 200 µl farbloses Basismedium und 20 µl EZ4U-Lösung pro Well. Daraufhin wurde die 96-Well-Platte 30 Minuten oder 60 Minuten in den Inkubator gestellt, je nachdem ob nach 30 Minuten bereits ein ausschlaggebender roter Farbumschlag erreicht wurde. Da durch Rückstände von Graphen und Siliciumdioxid die Messung gestört wurde, wurden 100 µl pro Well auf eine neue 96-Well-Platte pipettiert. Ein Teil der Nanopartikel wurde dabei auf die neue 96-Well-Platte verschleppt, und interferierte weiterhin mit der Messung. Im Anschluss wurde der Farbumschlag durch eine Adsorptionsmessung mit Tecan bestimmt. Gemessen wurde mit einer Wellenlänge von 450 nm mit 620 nm als Referenzwellenlänge.



### **2.4.3 MTT-Test**

Für den MTT-Test musste zunächst die Lösung mit Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) hergestellt werden. In einem schwarzen lichtundurchlässigen 5 ml fassenden Reaktionsgefäß wurde das im Kühlschrank gelagerte lichtempfindliche gelbe MTT-Pulver abgewogen. Zu 5 Teilen abgewogenen MTT-Pulver wurde 1 Teil farbloses Basismedium gegeben, sodass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml entstand. Die Stocklösung wurde gevortext und auf die Rüttelplatte gelegt. Nach abgelaufener 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen auf der 96-Well-Platte zweimal mit im Wasserbad auf 37°C erwärmten PBS gespült, um Ablagerungen von Graphen und Siliciumdioxid zu entfernen, welche die spätere Messung der Adsorption stören konnten. Dadurch konnten die Ablagerungen allerdings nicht restlos entfernt werden. Zur MTT-Stocklösung wurde die zehnfache Menge farbloses Basismedium dazu gegeben, um die MTT-Lösung herzustellen. Die MTT-Lösung ist lichtempfindlich, weshalb das Licht auf der sterilen Werkbank ausgeschaltet wurde. Pro Well wurden 100 µl MTT-Lösung mit der Mehrkanalpipette pipettiert. Die 96-Well-Platte wurde daraufhin unter Lichtschutz für vier Stunden in den Inkubator gestellt. Dabei kam es intrazellulär zur Bildung von blauen Kristallen, welche unter dem Mikroskop sichtbar waren. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden für eine Platte 14,4 ml Isopropanol (2-Propanol) und 600 µl Salzsäure (HCl) in ein Reagenzröhrchen gegeben. Von der entstandenen Acid-Isopropanol-Lösung wurden nach Ablauf der vierstündigen Inkubation 100 µl pro Well pipettiert, hierbei war kein steriles Vorgehen mehr notwendig. Die 96-Well-Platte wurde daraufhin für 10 min unter Lichtschutz auf die Rüttelplatte gestellt. Durch die Acid-Isopropanol-Lösung lysierten die Zellen, sodass der blaue Farbstoff freigesetzt wurde und sich durch das Rütteln gleichmäßig in den Wells verteilte. Im Anschluss wurde der Farbumschlag durch eine Adsorptionsmessung mit Tecan bestimmt. Gemessen wurde mit einer Wellenlänge von 540 nm mit 620 nm als Referenzwellenlänge.

### **2.4.4 LDH-Test**

Beim LDH-Test wird die Aktivität von Laktatdehydrogenase (LDH), welche in den meisten Zellen vorkommt, gemessen und daraus ein Rückschluss auf die vorhandene Menge an vitalen Zellen geschlossen. Das LDH-Kit wurde im Gefrierfach bei -80°C gelagert. Es umfasst vier verschiedene Fläschchen. Das Fläschchen mit der Nummer 1 enthielt den Catalyst. Es reichte für vier 96-Well-Platten. Das enthaltene Pulver wurde durch Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Nicht benötigter aufgelöster Catalyst wurde wieder eingefroren. Das Fläschchen mit der Nummer 2 enthielt die Dye Solution. Das Fläschchen mit der Nummer 3 enthielt die Lysis Solution. Und zuletzt das Fläschchen mit der Nummer 4, welches die Stop Solution enthielt. Die Fläschchen wurden aus dem Gefrierfach geholt und bei Raumluft aufgetaut, wobei das Fläschchen 1 zum Auftauen

auf Eis gestellt wurde. Nach abgelaufener 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen auf der 96-Well-Platte zweimal mit im Wasserbad auf 37°C erwärmten PBS gespült, um Ablagerungen von Graphen und Siliciumdioxid zu entfernen, welche die spätere Messung der Adsorption stören konnten. Dadurch konnten die Ablagerungen allerdings nicht restlos entfernt werden. Vom im Wasserbad bei 37°C erwärmten farblosen Basismedium wurden 11 ml in eine Petrischale gegeben. Dazu wurden 50 µl Lysis Solution pipettiert. Von dieser Mischung aus Lysis Solution und Medium wurden 105 µl pro Well auf die Zellen gegeben, nachdem das PBS von den Zellen abgesaugt wurde. Die 96-Well-Platte kam daraufhin für 15 min in den Inkubator. Hierbei werden die Zellen lysiert und das intrazelluläre LDH freigesetzt. Für den nächsten Schritt wurden in eine kleine Petrischale 11,25 ml der Dye Solution und 250 µl des Catalyst gegeben, um den Reaktionsmix herzustellen. Davon wurden 100 µl pro Well zusätzlich zu der Mischung aus Lysis Solution und Medium pipettiert. Daraufhin wurde die 96-Well-Platte bei Raumtemperatur für 10 Minuten dunkel gestellt. Währenddessen wurden 6 ml der Stop Solution in eine kleine Petrischale gegeben und nach Ablauf der 10 Minuten wurden hiervon 50 µl pro Well pipettiert. Die 96-Well-Platte wurde dann für weitere 10 Minuten auf die Rüttelplatte gestellt. Im Anschluss wurde der Farbumschlag durch eine Adsorptionsmessung mit Tecan bestimmt. Gemessen wurde mit einer Wellenlänge 492 nm ohne Referenzwellenlänge.

#### **2.4.5 CellTiter-Glo Assay**

Beim CellTiter-Glo Assay wird die Anzahl an vitalen Zellen indirekt über die Messung des vorhandenen Adenosintriphosphats (ATP) gemessen. ATP wird von vitalen, metabolisch aktiven Zellen produziert und reagiert mit dem CellTiter-Glo Reagent, welches daraufhin luminesziert. Das CellTiter-Glo Reagent wurde bei -20°C unter Lichtschutz gelagert. Vor Versuchsstart wurde es unter Lichtschutz bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach abgelaufener 24-stündiger Inkubation wurde die 96-Well-Platte aus dem Inkubator geholt und die Substanzen abdekantiert. Daraufhin wurden pro Well 100 µl von dem im Wasserbad auf 37°C erwärmtem Zellkulturmedium pipettiert. Die 96-Well-Platte wurde dann 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurden 100 µl pro Well des aufgetauten Reagent dazu pipettiert. Die 96-Well-Platte wurde für 2 Minuten unter Lichtschutz auf die Rüttelplatte gestellt und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden aus jedem Well 100 µl auf eine weiße 96-Well-Platte übertragen. In der weißen 96-Well-Platte erfolgte die Lumineszenz-Messung mit Tecan. Dabei wurde eine Messungszeit von 500 Millisekunden gewählt.

#### **2.5 Apoptose-Marker Bax und Caspase 3**

Um festzustellen ob die Substanzen Graphen und Siliciumdioxid eine Apoptose der Zellen induzierten, wurden die Apoptose-Marker Bax und Caspase 3 herangezogen. Bei

der Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaktion (RT-qPCR) wurde die Genexpression von Bax und Caspase 3 bestimmt. Mit dem Western Blot wurde die Menge an vorhandenem Bax und Caspase 3 gemessen, wobei bei Caspase 3 die inaktive und die aktive Form unterschieden wurden.

### **2.5.1 Zellkultivierung und Inkubation der Substanzen auf 6-Well-Platten**

Die 6-Well-Platte besteht aus drei Spalten und zwei Reihen. Nachdem die Zellen eine Woche in der T75 Zellkulturflasche heranwuchsen, wurden sie auf 6-Well-Platten ausgesät. Dabei wurde das gewohnte Teilungsverhältnis wie auch bei den T75 Zellkulturflaschen angewendet. Bei den Zelllinien cerebEND und HEK-293 wurden die 6-Well-Platten zuvor mit 0,5%iger Gelatinelösung beschichtet, analog zur Beschichtung der Zellkulturflaschen. Dafür wurde 1 ml 0,5%ige Gelatinelösung pro Well pipettiert. Nachdem die Gelatine 30 Minuten aushärten konnte, wurde der Überstand abgesaugt und die Platte war bereit, um Zellen aufzunehmen.

Für eine Versuchsreihe wurden acht Wells und somit zwei 6-Well-Platten benötigt. Die Zellen wurden eine Woche lang in den 6-Well-Platten kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Dafür wurde zunächst das Zellkulturmedium aus dem Kühlschrank im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Im Anschluss wurde das alte Zellkulturmedium aus den einzelnen Wells abgesaugt und dann in jedes Well 3 ml neues Zellkulturmedium pipettiert.

Nachdem die Zellen sieben Tage in den 6-Well-Platten herangewachsen waren, konnten die Substanzen zur 24-stündigen Inkubation auf die Platten gegeben werden. Zunächst wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt. Daraufhin wurden die Platten zweimal mit im Wasserbad auf 37°C erwärmten PBS gespült, dabei wurden pro Well 3 ml PBS gegeben und im Anschluss wieder abgesaugt.

Danach wurden die Substanzen zur 24-stündigen Inkubation auf die Zellen gegeben. Auf der ersten Platte wurde in die erste Reihe pro Well 3 ml der Graphen Suspension in den drei bekannten Konzentrationen gegeben. In die zweite Reihe wurde pro Well 3 ml der Siliciumdioxid Suspension in den drei bekannten Konzentrationen gegeben. Auf einer zweiten 6-Well-Platte waren zwei Wells für die Kontrollen vorgesehen. Wurden mehrere Versuchsreihen parallel durchgeführt, wurden die vier restlichen Wells dieser Platte für die anderen Versuchsreihen verwendet. Die Kontrollen wurden mit Basismedium inkubiert. Jedes Well wurde mit einem Volumen von 3 ml befüllt. Im Anschluss kamen die 6-Well-Platten zur 24-stündigen Inkubation in den Inkubator. Die folgende Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Einteilung der 6-Well-Platten bei der Inkubation.

Tabelle 12: Inkubation der 6-Well-Platten

Probe	Funktion	Abkürzung	6-Well-Platte
Graphen c1 (0,01 mg/ml)	Nanopartikel	G1	Patte 1
Graphen c2 (0,1 mg/ml)	Nanopartikel	G2	Patte 1
Graphen c3 (1 mg/ml)	Nanopartikel	G3	Patte 1
Siliciumdioxid c1 (0,01 mg/ml)	Nanopartikel	S1	Patte 1
Siliciumdioxid c2 (0,1 mg/ml)	Nanopartikel	S2	Patte 1
Siliciumdioxid c3 (1 mg/ml)	Nanopartikel	S3	Patte 1
Basismedium	Kontrolle	K1	Patte 2
Basismedium	Kontrolle	K2	Patte 2

## 2.5.2 Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Zur Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) wurde das NucleoSpin RNA Kit verwendet. Vor allen Arbeiten mit RNA-Proben wurden die Arbeitsflächen und verwendeten Pipetten mit RNase AWAY gereinigt, sowie Ribonuklease (RNase)-freie Materialien und Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die 6-Well-Platten aus dem Inkubator geholt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden pro Well mit 3 ml kaltem PBS gespült. Für jede Probe wurden jeweils 350 µl RA1-Lösung und 3,5 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) unter dem Abzug in einem 15 ml Röhrchen zusammen pipettiert und gevortext. Von dieser Mischung aus RA1-Lösung und  $\beta$ -ME wurden 350 µl auf die Zellen pipettiert, nachdem das PBS abgesaugt wurde. Dadurch wurden die Zellen abgelöst. Es entstand eine schleimige Lösung, die mit der Pipette aufgenommen wurde und in ein RNase-freies 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Diese RNA-Proben wurden alle sofort auf Eis gestellt. Nun war es möglich die Proben direkt weiter zu verarbeiten oder zur späteren Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  einzufrieren, um sie später wieder aufzutauen.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen RNA-Proben mit einer sterilen 1 ml fassenden Spritze aufgezogen und wieder zurück gespritzt. Dafür wurde eine 0,3 mm Kanüle bzw. 0,5 mm Kanüle für Graphen c2 und c3, da diese Proben nicht durch die 0,3 mm Kanüle passten, verwendet. Dieser Vorgang wurde pro Probe zehnmal durchgeführt. Dadurch wurden die Zellen lysiert. Im Anschluss wurden die Proben jeweils auf einen violetten NucleoSpin Filter, welcher sich in einem 2 ml Collection Tube befand, gegeben und bei 11.000 g für eine Minute zentrifugiert. Die Filter wurden verworfen und die Filtrate in den Collection Tubes wurden jeweils mit 350 µl 70%igem Ethanol vermischt und anschließend auf einen blauen NucleoSpin Filter, welcher sich bereits in einem Collection Tube

befand, gegeben. Daraufhin wurden die Proben für 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Die blauen Filter wurden nun in neue 2 ml fassende Collection Tubes gesteckt. Auf die Filter wurden dann jeweils 350 µl Membrane Desalting Buffer (MDB) gegeben. Dann wurden die Proben erneut eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Auf jeden blauen Filter wurden dann 95 µl DNase Reaktion Mixture gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert, um die vorhandene DNA abzubauen. Die DNase Reaktion Mixture wurde vorab in einem 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäß hergestellt. Für jede Probe wurden jeweils 90 µl Reaction Buffer und 10 µl DNase dazu gegeben. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgten drei Waschgänge. Im ersten Waschgang wurden auf jeden Filter 200 µl RAW2 pipettiert, zur Deaktivierung der DNase. Dann wurden die Proben wieder für 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Daraufhin kamen die blauen Filter in neue 2 ml fassende Collection Tubes. Nun wurden im zweiten Waschgang auf die Proben jeweils 600 µl RA3 pipettiert und nochmals für 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Daraufhin kamen die blauen Filter erneut in neue 2 ml fassende Collection Tubes. Im dritten und letzten Waschgang wurden auf die Proben im blauen Filter jeweils 250 µl RA3 pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 11.000 g. Dann wurden die blauen Filter in 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße gesteckt. Bei den cerebEND Zellen wurden nun auf jeden Filter 40 µl Nuklease-freies Wasser pipettiert. Bei den Caco-2, HepG-2, HEK-293 und H441 Zellen wurden 100 µl Nuklease-freies Wasser auf jeden Filter pipettiert. Davon ausgenommen waren die Siliciumdioxid c3 Proben bei HEK-293 und H441 Zellen. Hier wurden 40 µl Nuklease-freies Wasser pipettiert, da die RNA-Konzentration dieser Proben geringer war. Es folgte eine letzte Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 g, wobei die RNA mit dem Wasser aus dem Filter gespült wurde. Danach wurden die blauen Filter verworfen und die Reaktionsgefäße mit der enthaltenen RNA auf Eis gestellt. Nun war es möglich die Proben direkt weiter zu verarbeiten oder zur späteren Weiterverarbeitung bei -80°C einzufrieren, um sie später wieder aufzutauen. Vor Verwendung der Proben mussten sie auf Eis aufgetaut werden und dann gevortext und gespinnt werden.

Es folgte die Bestimmung der RNA-Konzentration der Proben. Alle RNA-Proben mussten auf die gleiche RNA-Konzentration verdünnt werden, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer. Dabei wurden zunächst zwei Referenzmessungen mit jeweils 1,2 µl Nuklease-freiem Wasser durchgeführt, bevor jede einzelne Probe gemessen wurde, wobei jeweils 1,2 µl der Probe auf das Messgerät aufgetragen wurden. War die RNA-Konzentration zu hoch, wurden die RNA-Proben mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die RNA-Konzentration erneut gemessen.

Als nächstes wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit aus den RNA-Proben komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) hergestellt. Die RNA-Proben wurden auf Eis gestellt. RNase-freie 0,2 ml fassende Reaktionsgefäße wurden auf einen Kühlständer, der aus einem Gefrierfach mit einer Temperatur von -20°C kam, gestellt. In diese Reaktionsgefäße wurden jeweils 6,8 µl des zuvor angesetzten Mastermix (siehe Tabelle 13) pipettiert. Jetzt mussten die RNA-Proben auf die gleiche Menge von 0,4 µg bei den cerebEND Zellen und 1 µg bei allen anderen Zelllinien gebracht werden. Auf Grundlage der Messung der RNA-Konzentration konnte das benötigte Volumen der RNA-Probe mit dem gewünschten RNA-Gehalt berechnet werden und in die 0,2 ml fassenden Reaktionsgefäße pipettiert werden. Es wurde so viel Nuclease-freies Wasser dazugegeben, damit RNA-Probe und Nuclease-freies Wasser zusammen ein Volumen von 13,2 µl erreichten. Das Gesamtvolumen inklusive Mastermix betrug 20 µl. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße gevortext, gespinnt und daraufhin in den Thermocycler zur cDNA-Synthese gestellt. Im Thermocycler wurden die Proben als Erstes für 10 Minuten bei 25°C inkubiert, danach für 120 Minuten auf 37°C zur Synthese von cDNA erhitzt und im Anschluss fünf Minuten auf 85°C erhitzt, um diese Reaktion zu stoppen. Nach Durchlaufen dieser Schritte wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4°C gekühlt. Nun war es möglich die Proben direkt weiter zu verarbeiten oder zur späteren Weiterverarbeitung bei -20°C einzufrieren, um sie später wieder aufzutauen.

*Tabelle 13: Mastermix zur cDNA-Herstellung mit Endvolumen von 6,8 µ für eine RNA-Probe*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
Multiscribe Rev. Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl

Für den nächsten Schritt wurde eine spezielle PCR-96-Well-Platte benötigt. Aus jeder einzelnen der acht Proben wurden drei verschiedene Genabschnitte bestimmt. Zum einen wurden dafür die Sonden für Bax und Caspase 3 als Apoptose-Parameter benötigt. Zudem wurde eine Sonde für Calnexin (CANX) als endogene Kontrolle gewählt. Dabei war darauf zu achten bei den cerebEND Zellen die mouse Sonden zu verwenden und bei allen anderen Zelllinien die humanen Sonden. Bei Arbeiten mit der Sonde wurde auf Lichtschutz geachtet. Für jede Probe und Sonde wurde eine dreifache Messung durchgeführt. Daher wurden 72 Wells der PCR-96-Well-Platte benötigt. In jedes Well wurden jeweils 10µl Master Mix und 1 µl der entsprechenden Sonde pipettiert. Die cDNA-Proben

wurden mit Nuclease-freiem Wasser 1:10 verdünnt. Dabei wurden zu jeder 20µl cDNA-Probe jeweils 180 µl Nuclease-freies Wasser pipettiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße gevortext und gespinnt. Von der verdünnten cDNA wurden auf die PCR-96-Well-Platte pro benötigtem Well jeweils 9 µl pipettiert. Die restliche cDNA wurde bei -20°C eingefroren. Die PCR-96-Well-Platte wurde mit PCR-Folie luftdicht abgeklebt und anschließend zentrifugiert.

Die fertig vorbereitete PCR-96-Well-Platte kam nun in das RT-PCR Gerät. Dort wurde sie zuerst für 20 Minuten auf 95°C erhitzt. Im Anschluss wurden 50 Zyklen durchlaufen, wobei die Platte zunächst für eine Minute auf 95°C erhitzt wurde und im Anschluss für 20 Minuten bei 60°C inkubiert wurde.

### 2.5.3 Western Blot

Nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln wurden die 6-Well-Platten aus dem Inkubator geholt und auf Eis gestellt. Das Medium wurde abgesaugt und pro Well wurde zweimal mit 3 ml eisgekühltem PBS gespült. In 10 ml PIPA-Puffer wurde eine Tablette Pick-Protease-Inhibitor-Cocktail aufgelöst. In Tabelle 14 ist die Zusammensetzung des RIPA-Puffers aufgeführt. Von dem entstandenen RIPA+ (RIPA mit Zusatz von Protease-Inhibitor) wurden jeweils 75 µl tropfenweise pro Well verteilt, nachdem das PBS abgesaugt wurde. Danach konnten die Zellen in den Wells mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt und jeweils in 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße pipettiert werden. Die so gewonnenen Proben wurden auf Eis gestellt. Nun war es möglich die Proben direkt weiter zu verarbeiten oder zur späteren Weiterverarbeitung bei -80°C einzufrieren, um sie später wieder aufzutauen.

*Tabelle 14: Zusammensetzung RIPA-Puffer*

Substanz	Konzentration
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris) pH 8,0	50 mM
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	0,1 %
Natriumdesoxycholat	0,5 %
Nonoxinol 40 (NP-40)	1 %

Im nächsten Schritt erfolgte die Lyse der Zellmembranen und Homogenisierung der Proben mittels Ultraschall-Homogenisator. Die Proben wurden auf Eis zehn aufeinander folgenden 0,5-Sekunden-langen Impulsen von 20 Watt mit dazwischenliegenden Pausen von 3 Sekunden ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben eine Minute bei 11.000 g

und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß pipettiert. Das Pellet wurde verworfen. Nun war es möglich die Proben direkt weiter zu verarbeiten oder zur späteren Weiterverarbeitung bei -80°C einzufrieren, um sie später wieder aufzutauen.

Als nächstes erfolgte die Proteinmengenbestimmung, um Proben mit der gleichen Gesamtproteinmenge herzustellen. Hierfür wurde das BCA Protein Assay Kit verwendet. Aus einer Bovine Serum Albumin (BSA)-Stocklösung mit 2.000 µg/ml wurde nach Herstellerangaben mit Aqua dest. eine Verdünnungsreihe angelegt und bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml verdünnt. Zudem wurde eine Leerprobe nur mit Aqua dest. vorbereitet (siehe Tabelle 15). Auf einer 96-Well-Platte wurden in die ersten beiden Spalten die BSA-Verdünnungsreihe und die Leerprobe pipettiert. Dabei wurden pro Well 25 µl pipettiert. In die Spalten 3 bis 5 wurden die Proteinproben pipettiert, wobei jede einzelne Probe dreifach pipettiert wurde. Pro Well wurden 23 µl Aqua dest. und 2 µl der Proteinprobe pipettiert. Die restlichen Spalten konnten für die Proteinbestimmung weiterer Versuchsreihen mitgenutzt werden. In der letzten Spalte wurden drei Wells für eine BLANK Referenzmessung jeweils mit 23 µl Aqua dest. und 2 µl RIPA+ gefüllt. Im Anschluss wurden in jedes verwendete Well 200 µl des zuvor hergestellten Working Reagent pipettiert. Das Working Reagent wurde zuvor durch eine Mischung von Reagent A und Reagent B im Verhältnis 50:1 hergestellt. Die 96-Well-Platte wurde 30 Minuten im Inkubator (Temperatur von 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nachdem die Platte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde eine Adsorptionsmessung bei 540 nm durchgeführt. Mit Hilfe der BSA-Verdünnungsreihe konnte der Proteingehalt der einzelnen Proben mit Excel berechnet werden.

*Tabelle 15: BSA-Verdünnungsreihe*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Reihe auf 96-Well-Platte</b>	<b>BSA-Konzentration [µg/ml]</b>
A (Stocklösung)	-	2.000
B	A	1.500
C	B	1.000
D	C	750
E	D	500
F	E	250
G	F	125
H	G	25
I	H	0



Als nächstes wurden die Protein-Proben auf die gleiche Menge von 30 µg gebracht. Mit Excel wurde ein Pipettierschema berechnet. Das benötigte Volumen der Protein-Proben wurde nach dem Schema in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und mit RIPA+ auf ein Volumen von 22,5 µl gebracht. Dazu wurden jeweils 7,5 µl einer Mischung aus Lämmli 4x und 6% β-ME pipettiert. Dies ergab ein Endvolumen von 30 µl. Im Anschluss wurden die Proben gevortext und gespinnt. Die Zusammensetzung von Lämmli 4x ist in Tabelle 16 dargestellt. Das im Lämmli enthaltene Sodiumdodecylsulfate (SDS) bewirkte eine Auflösung der Proteinstrukturen und eine Demaskierung der Proteinladungen, infolgedessen die Proteine nun nur noch in ihrer Primärstruktur vorlagen und alle gleich negativ geladen waren. Das im kalten Zustand zähflüssige Lämmli wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt, damit es besser pipettiert werden konnte. Die restlichen Protein-Proben wurden bei -80°C für eine eventuelle spätere Verwendung eingefroren. Die mit Lämmli und β-ME versetzten Proben wurden auf einer Heizplatte für fünf Minuten auf 70°C erhitzt, was die Denaturierung der Proteine in ihre Primärstruktur unterstützte. Im Anschluss wurden die so vorbereiteten Proben wie im übernächsten Kapitel beschrieben direkt auf das Sammelgel in der Elektrophorese-Kammer aufgetragen.

*Tabelle 16: Zusammensetzung Lämmli 4x*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
SDS	4 g
Glycerol	20 ml
Bromphenol Blue	0,002 g
1M Tris HCl pH 6,8	12,5 ml

Die für die Elektrophorese benötigten Gele wurden mit ausreichendem Vorlauf gegossen, damit sie Zeit hatten auszuhärten. Dies geschah meist am Vortag der Gelelektrophorese. Dazu wurden zwei spezielle Glasplatten in eine Vorrichtung gespannt. Zwischen den Glasplatten entstand ein 1,5 mm breiter spaltförmiger Hohlraum. Als erstes wurde das 15%ige Trenngel wie in Tabelle 17 aufgeführt unter dem Abzug angesetzt und gut durchmischt. Sobald Tetramethylethylenediamine (TEMED) zugegeben wurde, begann das Gel auszuhärten und musste sogleich in den Hohlraum zwischen den Glasplatten gegossen werden. Auf das Trenngel wurde eine dünne Lage Isopropanol pipettiert, um am oberen Rand des Trenngels eine glatte waagerechte Kante zu erhalten. Nach 30 Minuten war das Trenngel ausgehärtet und das Isopropanol konnte abgekippt werden. Daraufhin wurde das Sammelgel wie in Tabelle 18 aufgeführt unter dem Abzug angesetzt und gut gemischt. Auch hier galt, dass der Aushärtungsprozess mit Zugabe von TEMED startete, sodass es direkt nach dem Ansetzen auf das Trenngel gegossen

wurde. In das noch flüssige Sammelgel wurde von oben zwischen die Glasplatten ein 1,5 mm breiter Plastikkamm mit 15 Zacken gedrückt, bis er oben bündig mit den Glasplatten abschloss. Dadurch entstanden 15 Vertiefungen im Sammelgel. In diese so genannten Taschen wurden im nächsten Schritt die fertig vorbereiteten Proteinproben aufgeladen. Das Sammelgel musste ebenfalls 30 Minuten aushärten.

*Tabelle 17: Zusammensetzung Trenngel (15%)*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Aqua dest.	2,35 ml
Rotiophorese Gel	5 ml
3M Tris pH 8,8	2,5 ml
10%iges SDS	100 µl
10%iges APS	100 µl
TEMED	6 µl

*Tabelle 18: Zusammensetzung Sammelgel*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Aqua dest.	3,48 ml
Rotiophorese Gel	850 µl
1M Tris pH 6,8	625 µl
10%iges SDS	50 µl
10%iges APS	50 µl
TEMED	5 µl

Das vorbereitete Elektrophorese-Gel wurde in eine Elektrophorese Kammer eingebaut. In eine Elektrophorese Kammer passten maximal zwei Gele. Die innere Kammer wurde bis zum Überlaufen mit frischem Elektrophorese Puffer aufgefüllt. Tabelle 19 zeigt die Zusammensetzung des Elektrophorese Puffers. Die äußere Kammer wurde ebenfalls mit Elektrophorese Puffer befüllt, allerdings nur bis etwa 1 cm unterhalb des oberen Randes, damit die beiden Kammern keinen Kontakt zueinander bekamen und somit auch kein Strom außen über die Kammern fließen konnte. Nun wurde der Plastikkamm, der zur Formung der Taschen im Sammelgel verwendet wurde, aus dem Sammelgel senkrecht nach oben herausgezogen. Die Taschen füllten sich dabei mit Elektrophorese-Puffer. Es wurde so viel Elektrophorese-Puffer nachgegossen, bis die Innere Kammer wieder randvoll war. Von den insgesamt 15 Taschen wurden die erste, die zehnte und die zwölfte mit 3 µl Bandenmarker und 17 µl einer Mischung aus Lämmli 4x und RIPA+ im

Verhältnis 1:4 beladen. In die Taschen drei bis neun wurden jeweils 20 µl der vorbereiteten Proteinproben aufgeladen. Die Taschen zwölf bis fünfzehn blieben unbesetzt.

*Tabelle 19: Zusammensetzung Elektrophorese-Puffer*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Tris	6,04 g
Glycin	28,8 g
SDS	2 g
Aqua dest.	Ad 2 l

Es folgte die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page). Hierbei wurden die Proteine anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. An die Elektrophorese-Kammer wurde eine Spannung von 60 V angelegt. Dadurch wanderten die in die Taschen aufgetragenen Protein-Proben von der Kathode weg zur Anode durch das Sammelgel. Die Funktion des Sammelgels besteht darin, die Protein-Proben in den Taschen zu bündeln und geradlinig auf den Weg in Richtung Trenngel zu senden. Nach 30 bis 40 Minuten hatten die Proben das Sammelgel passiert und das Trenngel erreicht. Daraufhin wurde die Spannung auf 135 V erhöht. Je kleiner die Proteine waren, desto schneller konnten sie das Trenngel passieren. Je größer sie waren, desto langsamer. Nach etwa 1 Stunde und 15 Minuten war die vorderste Lauffront, die durch das enthaltene blaue Lämmli gut zu erkennen war, fast am unteren Ende des Trenngels angelangt. Dann wurde die Elektrophorese beendet. Die in den Taschen eins, zehn und elf aufgeladenen Marker bildeten nun eine bunte Bande, wobei jede Farbe einer Proteingröße zugeordnet werden konnte.

Im nächsten Schritt wurden die Proteinproben aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) mittels Semidry-Blot übertragen. Zunächst wurde das Trenngel aus der Elektrophorese-Kammer ausgebaut. Unter dem Abzug wurde die PVDF-Membran für eine Minute zur Aktivierung in Methanol getaucht. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran, sowie zwei Blotting Papiere und zwei Fils-Platten in Towbin-Puffer getränkt. Der Towbin-Puffer setzte sich wie in Tabelle 20 angegeben zusammen. Weiterhin unter dem Abzug wurden das Trenngel und die PVDF-Membran zwischen die zwei Blotting Papiere, welche wiederum von den zwei Fils-Platten umgeben waren, in einen mit Towbin-Puffer gefüllten Tankblot zwischen die Anoden- und die Kathoden-Platte geklemmt. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen entstanden. Es passten maximal vier der so vorbereiteten Gele in einen Tankblot. Der Tankblot wurde in einen Kühlraum mit einer Temperatur von 4°C gebracht. Es wurde eine Spannung von 100 V und eine Stromstärke von 80

mA für mindestens 12 Stunden angelegt. Wurden in einem Tankblot mehr als zwei Gele eingesetzt, wurde für jedes weitere Gel die Spannung um 40 mA erhöht. Dadurch wurden die Proteinbanden und die bunten Markerbanden von dem Trenngel auf die PVDF-Membran übertragen, wobei nur letztere optisch sichtbar waren.

*Tabelle 20: Zusammensetzung Towbin-Puffer*

Substanz	Menge
Tris	6,06 g
Glycin	28,83 g
10%iges SDS	7,5 ml
Methanol	400 ml
Aqua dest.	Ad 2 l

Als nächstes wurde die PVDF-Membran mit den darauf übertragenen Protein-Banden aus dem Tankblot entnommen und in ein schwarzes lichtundurchlässiges Schälchen mit 20 ml 5% Milch in PBS (siehe Tabelle 21) gelegt und für eine Stunde auf die Rüttelplatte gestellt. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Die Membran verblieb auch bei allen folgenden Schritten in diesem Schälchen.

*Tabelle 21: Zusammensetzung 5% Milch in PBS*

Substanz	Menge
Milchpulver	50 g
PBS	Ad 1 l

Es folgte die Inkubation mit Antikörpern zur Protein-Bestimmung. Die dafür benötigten Antikörper sind in der folgenden Tabelle 22 zusammengestellt. Sie wurden im Gefrierfach bei -20°C gelagert.

*Tabelle 22: Western Blot Antikörper*

Antikörper	Typ	Ursprung	Verdünnung	Molekulargewicht des Ziel-Proteins
Bax Antibody	primär	rabbit	1:1.000	20 kDa
Caspase-3 Antibody	primär	rabbit	1:1.000	17, 19, 35 kDa
Anti-rabbit IgG	sekundär	goat	1:3.000	-
β-Aktin	primär + sekundär	mouse	1:25.000	42 kDa

Nach dem einstündigen Blocken der Membran wurde die 5% Milch in PBS abgekippt. Der primäre Antikörper wurde auf die Membran gegeben. Im ersten Durchgang waren das 6 µl Bax Antikörper, die in 6 ml 5% BSA in 0,1% Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (TWEEN) in PBS verdünnt wurden. Im zweiten Durchgang waren es 6 µl Caspase-3 Antikörper, die in 6 ml 5% Milch in 0,1% TWEEN in PBS verdünnt wurden. Das Schälchen wurde mit Parafilm-Folie abgedichtet und über Nacht für 12 bis 16 Stunden im Kühlraum bei 4°C auf die Rüttelplatte gestellt. Dabei lagerten sich die primären Antikörper auf der entsprechenden Protein-Bande auf der Membran an. Je länger die Inkubationszeit andauerte, desto kräftiger war die später aufgenommene Bande aber auch das Hintergrundsignal. Nach Ablauf der Inkubation wurde wieder bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Lösung mit dem primären Antikörper wurde abgekippt. Die Membran wurde dreimal für jeweils zehn Minuten auf der Rüttelplatte mit 0,1%TWEEN in PBS gewaschen. Anschließend wurde sie nochmals 20 Minuten auf der Rüttelplatte mit 5% Milch in PBS geblockt. 3,3 µl des Anti-rabbit IgG wurden mit 10 ml 0,1% TWEEN in PBS vermischt und für eine Stunde auf der Rüttelplatte auf die Membran im Schälchen gegeben. Der sekundäre Antikörper band dabei an den bereits auf der Membran gebundenen primären Antikörper. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für jeweils zehn Minuten auf der Rüttelplatte mit 0,1% TWEEN in PBS gewaschen. Danach wurde die lichtempfindliche Entwicklerlösung aus 4 ml ECL I und ECL II hergestellt. Sie wurde sogleich auf die Membran gegeben und das Schälchen wurde zum Lichtschutz mit seinem Deckel verschlossen. Die Membran wurde für zwei Minuten in der Entwicklerlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran aus dem Schälchen entnommen und das Bandenmuster konnte mit dem Imager abgelichtet werden. Die mit dem Imager aufgenommenen Bandenmuster wurden später mit ImageJ ausgemessen. Nach der Belichtung wurden die Antikörper wieder von der Membran entfernt, um danach eine weitere Protein-Bande nachweisen zu können. Dafür wurde die Membran auf der Rüttelplatte wie folgt gewaschen: 5 Minuten mit Aqua dest., 5 Minuten mit 0,2 M NaOH, 5 Minuten mit Aqua dest. und 10 Minuten mit 0,1% TWEEN in PBS. Jetzt konnte die Membran wieder von vorne bearbeitet werden, beginnend mit dem einstündigen Blocken in 5% Milch in PBS.

Waren die beiden primären Antikörper für Bax und Caspase-3 abgelichtet worden, wurde anschließend eine Referenz-Bande mit  $\beta$ -Aktin abgelichtet. Dafür wurde die frisch von den vorherigen Antikörpern gereinigte Membran erneut eine Stunde auf der Rüttelplatte in 5% Milch in PBS geblockt. 1 µl  $\beta$ -Aktin wurde mit 25 ml 1% BSA in PBS vermischt und die Membran darin auf der Rüttelplatte für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten auf der Rüttelplatte mit

0,1%TWEEN in PBS gewaschen. Danach konnte die Membran wie im vorherigen Abschnitt beschrieben entwickelt und mit dem Imager abgelichtet werden. Anschließend wurde die Membran wie oben beschrieben wieder von den Antikörpern gereinigt. Die Membran wurde zur eventuellen späteren Verwendung in 0,1% TWEEN in PBS im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.

In den folgenden Tabellen 23 bis 28 werden die Zusammensetzungen der in den vorherigen Abschnitten angesprochenen Lösungen aufgeführt. Die Tabelle 29 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der Verarbeitung der PVDF-Membran.

*Tabelle 23: Zusammensetzung 0,1% TWEEN in PBS*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
TWEEN	1 ml
PBS	1 l

*Tabelle 24: Zusammensetzung 5% BSA in 0,1% TWEEN in PBS*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
BSA	0,3 g
0,1% TWEEN in PBS	6 ml

*Tabelle 25: Zusammensetzung 5% Milch in 0,1% TWEEN in PBS*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Milchpulver	0,3 g
0,1% TWEEN in PBS	6 ml

*Tabelle 26: Zusammensetzung 1% BSA in PBS*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
BSA	2 g
PBS	200 ml

*Tabelle 27: Zusammensetzung 50 ml ECL I*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
250 mM Luminol in DMSO	1 ml
90 mM PCA (p-Coumaric-Acid) in DMSO	440 µl
1 M Tris pH 8,8	5 ml
Aqua dest.	Ad 50 ml

*Tabelle 28: Zusammensetzung 50 ml ECL II*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
1 M Tris pH 8,8	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	32 µl
Aqua dest.	Ad 50 ml

Tabelle 29: Übersicht Inkubation der Membran für den Western Blot

Vorgang	Zeit	Substanz	Menge
Blocken	1 h	5% Milch in PBS	20 ml
Inkubation primärer Antikörper (bei 4°C)	12 - 16 h (über Nacht)	Bax Antikörper in 5% BSA in 0,1% TWEEN in PBS oder: Caspase-3 Antikörper in 5% Milch in 0,1% TWEEN in PBS	6 µl / 6 ml
1. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
2. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
3. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
Blocken	20 min	5% Milch in PBS	10 ml
Inkubation Anti-rabbit IgG	1 h	Anti-rabbit IgG in 1% BSA in PBS	3,3 µl / 10 ml
1. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
2. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
3. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
Entwickeln	2 min	Entwicklerlösung (ECL I + ECL II)	8 ml
Entwickeln mit dem Imager			
Reinigung	5 min	Aqua dest.	10 ml
Reinigung	5 min	0,2 M NaOH	10 ml
Reinigung	5 min	Aqua dest.	10 ml
Reinigung	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
Wieder von vorne mit dem zweiten primären Antikörper			
Blocken	1 h	5% Milch in PBS	20 ml
Inkubation mit Anti-β-Aktin	1 h	Anti-β-Aktin in 1% BSA in PBS	1 µl / 25 ml
1. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
2. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
3. Waschen	10 min	0,1% TWEEN in PBS	10 ml
Entwickeln	2 min	Entwicklerlösung (ECL I + ECL II)	8 ml
Entwickeln mit dem Imager			



## **2.6 Statistische Auswertung**

Alle Versuche sind unabhängig voneinander dreimal durchgeführt worden. Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Der T-Test wurde mit GraphPad Prism Version 8 berechnet. Dabei wurde die statistische Signifikanz bei  $p < 0,05$  angenommen. Alle Daten sind als Mittelwerte aus den drei unabhängigen Versuchen hervorgegangen. Die Grafiken wurden ebenfalls mit GraphPad Prism Version 8 erstellt. Dabei wurden statistisch signifikante Ergebnisse mit \* gekennzeichnet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Zellviabilität**

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml auf 96-Well-Platten inkubiert. Um die Vitalität der Zellen nach Ablauf der Inkubation zu messen, wurden Tests auf Basis von Adsorptions- und Lumineszenz-Messung durchgeführt. Zu den auf Adsorptions-Messung basierenden Tests zählten MTT-Test, LDH-Test und EZ4U-Test. Der einzige auf Lumineszenz-Messung basierende Test war der CellTiter-Glo-Assay. Im Rahmen der Vorversuche wurden der MTT-Test und der LDH-Test wieder verlassen. Es verblieben der EZ4U und der CellTiter-Glo Assay, deren Ergebnisse in den folgenden beiden Kapiteln dargestellt werden.

Der Blank-Wert (Basismedium, keine Zellen) diente dazu Hintergrundsignale herausrechnen zu können. Der Mittelwert der Blank-Werte auf einer 96-Well-Platte wurde von allen Einzelwerten der gleichen 96-Well-Platte abgezogen, bevor diese Werte für weitere Berechnungen herangezogen wurden. Beim CellTiter-Glo Assay kam es zu vereinzelt extremen Ausreißern bei den Blank-Werten, diese wurden vor der Berechnung ausgeschlossen.

Die einzelnen Messwerte einer Versuchsplatte (96-Well-Platte) wurden dann auf die jeweilige Kontrolle des jeweiligen Versuchs normiert. Somit betrug die Zellviabilität der Kontrolle in jedem Versuch 1 (= 100%). Daraus ergab sich für die Kontrollen immer ein Mittelwert von 1 (= 100%) und eine Standardabweichung von 0 (= 0%).

Die positiv-Kontrolle mit 10% FCS und die negativ-Kontrolle mit 10% DMSO wurden in den Graphiken nicht mit dargestellt. Diese Kontrollen dienten vor allem der Selbstkontrolle.

Bei 10% FCS war ein zusätzliches Zellwachstum zu erwarten, da in allen anderen Ansätzen keine Wachstumsfaktoren zugegeben wurden. Ein Anstieg des Zellwachstums war allerdings nur zu erwarten, wenn in den Wells noch Platz für weiteres Zellwachstum

vorhanden war. Waren die Wells zu Beginn der 24-stündigen Inkubation bereits dicht bewachsen, blieb eine starke Zellvermehrung aus.

Im CellTiter-Glo Assay zeigte sich bei der Zelllinie cerebEND ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf  $205\% \pm 18\%$  bei 10% FCS. Bei der Zelllinie Caco-2 zeigte sich ein Anstieg der Zellviabilität auf  $131\% \pm 26\%$  für 10% FCS, der allerdings nicht statistisch signifikant war. Die Zelllinie HepG-2 stieg bei 10% FCS mit der Zellviabilität auf  $113\% \pm 37\%$  an, dieses Ergebnis war nicht statistisch signifikant. Die Zelllinie HEK-293 zeigte bei 10% FCS ebenfalls keinen statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität mit  $101\% \pm 21\%$ . Bei der Zelllinie H441 ergab sich eine Zellviabilität von  $119\% \pm 15\%$  bei 10% FCS, was keinem statistisch signifikanten Anstieg entsprach.

Im EZ4U-Test zeigte sich bei der Zelllinie cerebEND ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf  $335\% \pm 80\%$  bei 10% FCS. Die Zelllinie Caco-2 zeigte mit einem Anstieg der Zellviabilität auf  $128\% \pm 28\%$  bei 10% FCS keinen statistisch signifikanten Anstieg. Bei der Zelllinie HepG-2 stieg die Zellviabilität bei 10% FCS statistisch signifikant auf  $132\% \pm 12\%$  an. Die Zelllinie HEK-293 verzeichnete bei 10% FCS einen ebenfalls einen statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität auf  $160\% \pm 5\%$ . Bei der Zelllinie H441 fiel die Zellviabilität bei 10% FCS sogar auf  $88\% \pm 16\%$  ab, was keinem statistisch signifikanten Ergebnis entsprach.

Bei 10% DMSO war aufgrund seiner toxischen Wirkung ein Rückgang der Zellzahl zu erwarten. Dies war bei den einzelnen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Vermutlich aufgrund der Sensibilität der einzelnen Zelllinien gegenüber der Noxe.

Im CellTiter-Glo Assay zeigte sich bei der Zelllinie cerebEND ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $12\% \pm 2\%$  für 10% DMSO. Bei der Zelllinie Caco-2 fiel bei 10% DMSO die Zellviabilität auf  $89\% \pm 7\%$  ab, was keinem statistisch signifikanten Ergebnis entsprach. Die Zelllinie HepG-2 zeigte bei 10% DMSO ebenfalls keinen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität mit  $67\% \pm 12\%$ . Bei der Zelllinie HEK-293 zeigte sich bei 10% DMSO ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $31\% \pm 5\%$ . Und bei der Zelllinie H441 zeigte sich bei 10% DMSO ebenfalls ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $48\% \pm 15\%$ .

Im EZ4U-Test zeigte sich bei der Zelllinie cerebEND für 10% DMSO ein Abfall der Zellviabilität auf  $65\% \pm 8\%$ , der statistisch nicht signifikant war. Für die Zelllinie Caco-2 ergab sich bei 10% DMSO ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $26\% \pm 9\%$ . Bei der Zelllinie HepG-2 zeigte sich bei 10% DMSO ebenfalls ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $78\% \pm 2\%$ . Die Zelllinie HEK-293 zeigte bei 10% DMSO einen

Abfall der Zellviabilität auf  $43\% \pm 4\%$ , was ebenfalls einem statistisch signifikanten Ergebnis entsprach. Und zuletzt zeigte sich bei der Zelllinie H441 bei 10% DMSO auch ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $24\% \pm 4\%$ .

### **3.1.1 EZ4U-Test**

Die EZ4U Ergebnisse sind aufgrund einer Interferenz der Nanopartikel mit der Messmethode mit Vorsicht zu betrachten, wie im Kapitel 4 Diskussion noch weiter erläutert wird.

Beim EZ4U-Test der Zelllinie cerebEND zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml mit einer Zellviabilität von  $135\% \pm 41\%$  kein statistisch signifikanter Anstieg. In der nächsthöheren Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich für Graphen mit einer Zellviabilität von  $132\% \pm 16\%$  auch kein signifikanter Anstieg. Dahingegen zeigte sich bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf  $225\% \pm 8\%$ , dem allerdings mikroskopisch kein vermehrtes Zellwachstum zugeordnet werden konnte. Für Siliciumdioxid ergab sich bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml ein Anstieg der Zellviabilität auf  $123\% \pm 20\%$ , was keinem statistisch signifikanten Ergebnis entsprach. In der Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich bei Siliciumdioxid allerdings ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf  $178\% \pm 21\%$ . Dieser Anstieg konnte mikroskopisch allerdings ebenfalls nicht bestätigt werden. In einer Konzentration von 1 mg/ml Siliciumdioxid zeigte sich dahingegen ein Abfall der Zellviabilität auf  $60\% \pm 6\%$ , ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis. In diesem Fall konnte das mikroskopische Bild in Einklang mit den Messwerten gebracht werden. Die Ergebnisse des EZ4U-Tests für die Zelllinie cerebEND sind in Abbildung 1 dargestellt.

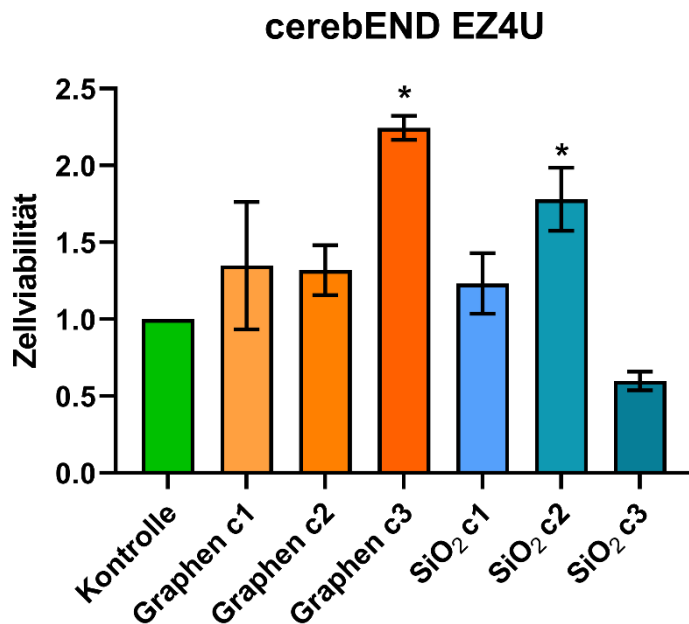


Abbildung 1: EZ4U Test der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 und SiO<sub>2</sub> c3 zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität.

Für die Zelllinie Caco-2 ergab der EZ4U Test die in der Abbildung 2 dargestellten Ergebnisse. Es zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf 123% ± 15% und für die Konzentration 0,1 mg/ml ein ebenfalls statistisch nicht signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf 130% ± 20%. Bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich dahingegen ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf 28% ± 9%. Für Siliciumdioxid ergab sich bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf 153% ± 16%. Auch für eine Konzentration von 0,1 mg/ml Siliciumdioxid ergab sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf 148% ± 25%. Diesen beiden Anstiegen konnte mikroskopisch allerdings kein Bild eines vermehrten Zellwachstums zugeordnet werden. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeige sich kein statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität mit 120% ± 25%.

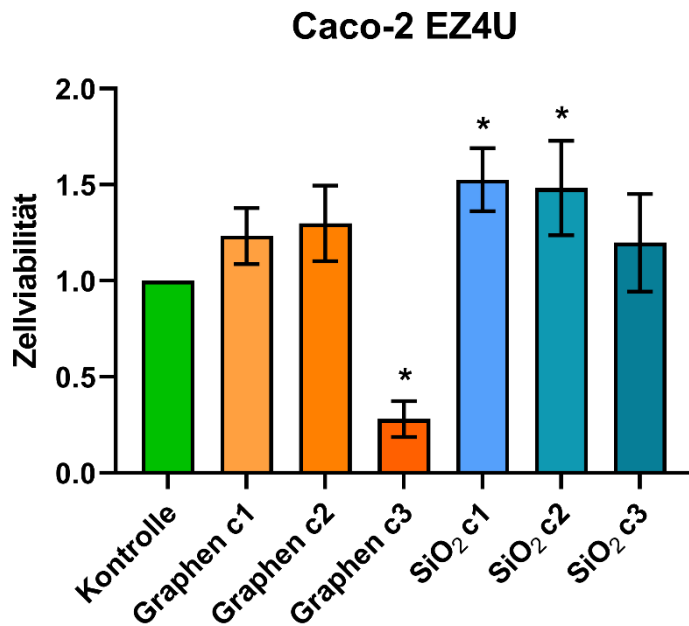


Abbildung 2: EZ4U Test der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. Dahingegen zeigten SiO<sub>2</sub> c1 und c2 einen statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität.

Der EZ4U-Test der Zelllinie Hep G2 ergab für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 97% ± 4%. Für die Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 95% ± 1%. Dahingegen zeigte sich bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf 42% ± 1%. Bei Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 96% ± 1%. Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml zeigte eine geringe, aber statistisch nicht signifikante Abnahme der Zellviabilität auf 89% ± 0%. Eine Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml ergab eine leichte Erhöhung der Zellviabilität auf 111% ± 12%, dieses Ergebnis war statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse des EZ4U-Tests der Zelllinie Hep G2 sind in der folgenden Abbildung 3 dargestellt.

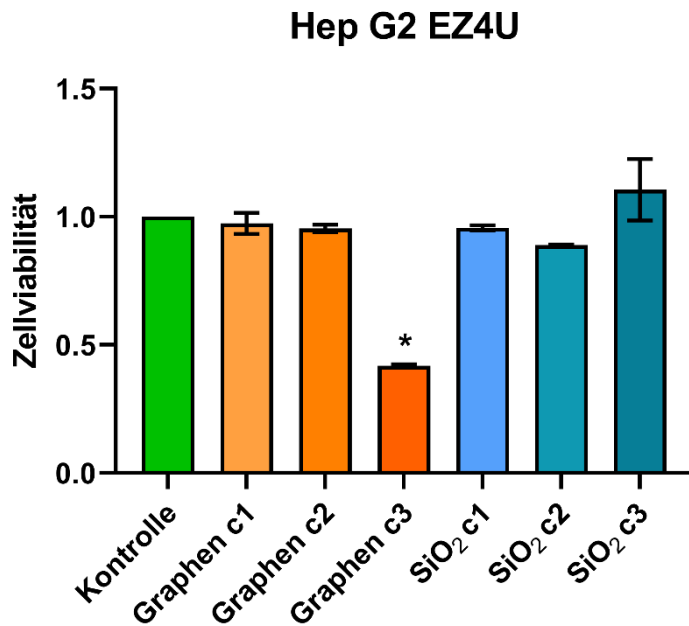


Abbildung 3: EZ4U Test der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität.

Bei der Zelllinie HEK-293 ergab der EZ4U-Test für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 104% ± 2%. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 99% ± 8%. Dahingegen ergab eine Graphen Konzentration von 1 mg/ml eine statistisch signifikante Abnahme der Zellviabilität auf 53% ± 1%. Bei Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 109% ± 10%. Für eine Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine leicht erhöhte, aber statistisch nicht signifikante Erhöhung der Zellviabilität auf 113% ± 5%. Schließlich zeigte sich bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml eine Abnahme der Zellviabilität auf 85% ± 12%, ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis. In der folgenden Abbildung 4 sind die Ergebnisse des EZ4U-Tests der Zelllinie HEK-293 dargestellt.

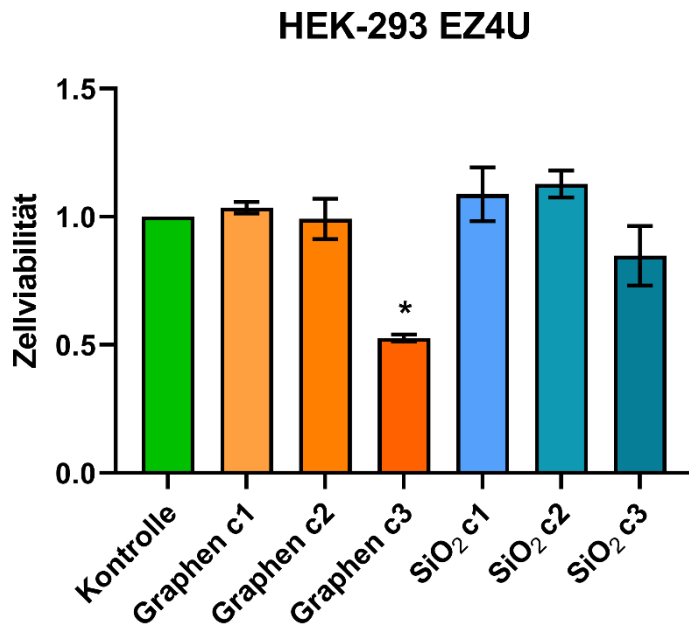


Abbildung 4: EZ4U Test der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität.

Der EZ4U-Test ergab bei der Zelllinie H441 für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit  $93\% \pm 7\%$ . Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $72\% \pm 9\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich ein noch stärkerer Abfall der Zellviabilität auf  $41\% \pm 4\%$ , der ebenfalls statistisch signifikant war. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit  $101\% \pm 14\%$ . Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit  $92\% \pm 12\%$ . Schließlich zeigte sich bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf  $54\% \pm 8\%$ . Die Ergebnisse des EZ4U-Tests der Zelllinie H441 sind in der folgenden Abbildung 5 dargestellt.

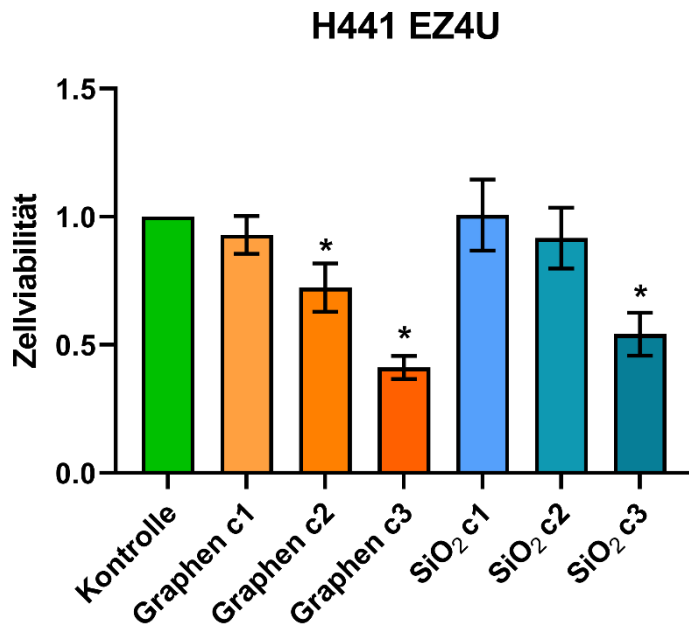


Abbildung 5: EZ4U Test der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c2 und c3, sowie SiO<sub>2</sub> c3 zeigten einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität.

### 3.1.2 CellTiter-Glo Assay

Im Folgenden werden die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay für die Zelllinie cerebEND aufgeführt. Bei Graphen zeigten sich bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml mit einer Zellviabilität von 92% ± 12% und bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit einer Zellviabilität von 90% ± 16% keine statistisch signifikanten Veränderungen. Bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter Abfall der Zellviabilität auf 78% ± 7%. Siliciumdioxid zeigte für die ersten beiden Konzentration ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellviabilität mit 83% ± 21% bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml und 86% ± 36% bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Schließlich zeigte sich bei einer Konzentration von 1 mg/ml ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf 43% ± 9%. Die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assays der Zelllinie cerebEND sind in der folgenden Abbildung 6 dargestellt.



## cerebEND CellTiter-Glo Assay

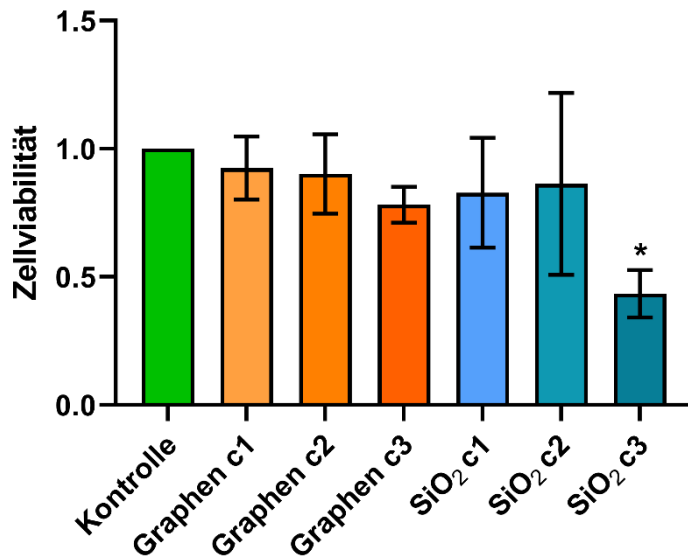


Abbildung 6: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. SiO<sub>2</sub> c3 zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität.

Die Zelllinie Caco-2 zeigte im CellTiter-Glo Assay für Graphen keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellviabilität mit 98% ± 25% bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml, mit 104% ± 18% bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml und mit 91% ± 8% bei einer Konzentration von 1 mg/ml. Bei Siliciumdioxid zeigten sich bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml zunächst ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf 131% ± 14%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich ein leichter aber ebenfalls nichts statistisch signifikanter Anstieg der Zellviabilität auf 118% ± 21%. Eine Konzentration von 1 mg/ml ergab bei Siliciumdioxid ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 99% ± 9%. Für die Zelllinie Caco-2 sind die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay in der folgenden Abbildung 7 dargestellt.

## Caco-2 CellTiter-Glo Assay

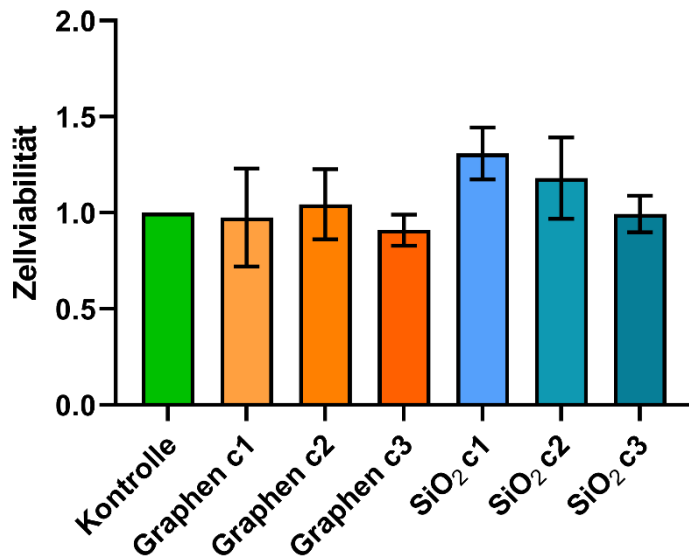


Abbildung 7: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Im Folgenden sind die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay für die Zelllinie Hep G2 dargestellt. Für eine Graphen Konzentration von 0,01 mg/ml zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der Zellviabilität auf 114% ± 22%. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 90% ± 26%. Graphen der Konzentration 1 mg/ml zeigte eine deutliche Abnahme der Zellviabilität auf 68% ± 20%, jedoch ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis. Für Siliciumdioxid der Konzentration von 0,01 mg/ml ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 104% ± 16%. Auch bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich mit 100% ± 29% keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich ein deutlicher Abfall der Zellviabilität auf 66% ± 14%, jedoch ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis. Die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay für die Zelllinie Hep G2 sind in der folgenden Abbildung 8 dargestellt.

## Hep G2 CellTiter-Glo Assay

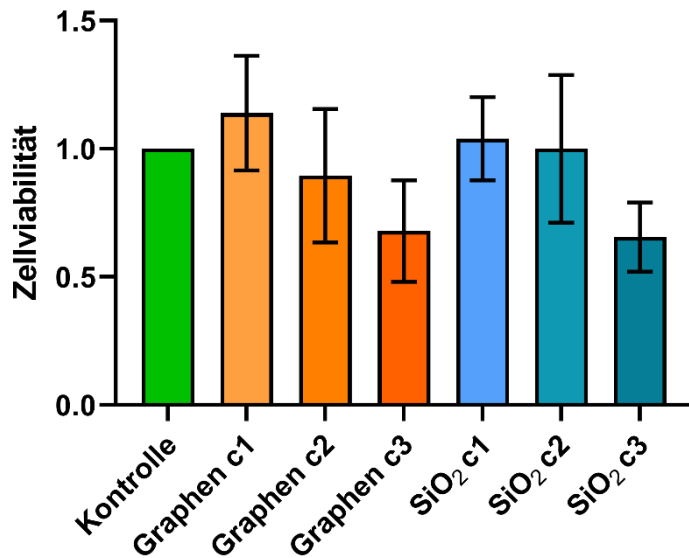


Abbildung 8: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Für die Zelllinie HEK-293 zeigte der CellTiter-Glo Assay bei Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml mit einer Zellviabilität von 98% ± 5% und bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit einer Zellviabilität von 102% ± 6% keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellviabilität. Dahingegen zeigte sich bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf 76% ± 15%. Ähnlich verhielt es sich bei Siliciumdioxid. Bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml mit einer Zellviabilität von 97% ± 4% und bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit einer Zellviabilität von 94% ± 4% traten keine statistisch signifikanten Veränderungen auf. Doch bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität auf 15% ± 1%. Die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay der Zelllinie HEK-293 sind in der folgenden Abbildung 9 dargestellt.

## HEK-293 ZellTiter-Glo Assay

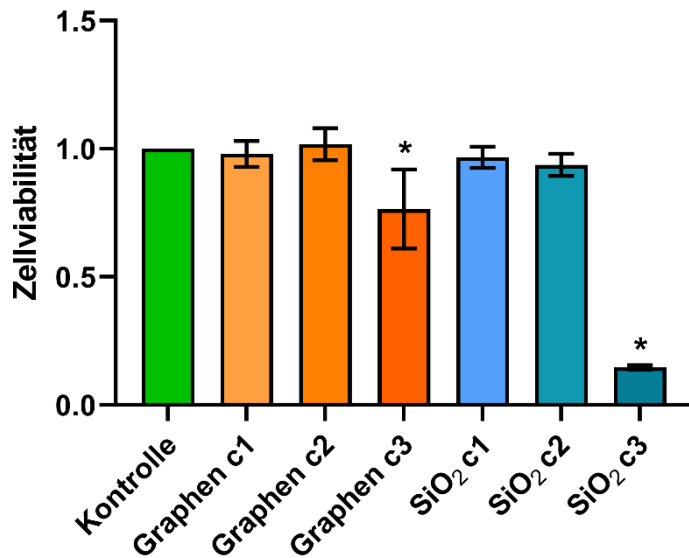


Abbildung 9: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 und SiO<sub>2</sub> c3 zeigten einen signifikanten Abfall der Zellviabilität.

Im CellTiter-Glo Assay der Zelllinie H441 zeigten sich bei einer Graphen Konzentration von 0,01 mg/ml mit einer Zellviabilität von 103% ± 17% und bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit einer Zellviabilität von 94% ± 10% keine statistisch signifikanten Veränderungen. Dahingegen zeigte sich bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität auf 54% ± 4%. Bei Siliciumdioxid einer Konzentration von 0,01 mg/ml zeigte sich ein leichter, statistisch nicht signifikanter Abfall der Zellviabilität auf 84% ± 5%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität mit 97% ± 18%. Dahingegen zeigte Siliciumdioxid einer Konzentration von 1 mg/ml einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität auf 52% ± 10%. Die folgende Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assays der Zelllinie H441.

## H441 CellTiter-Glo Assay

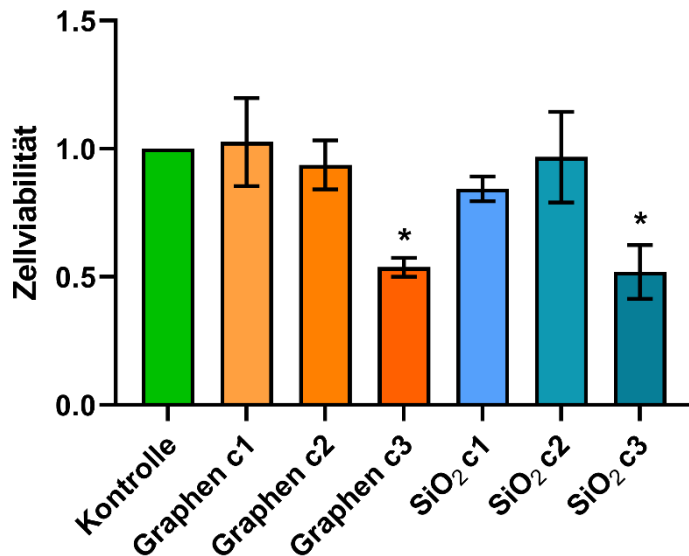


Abbildung 10: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 und SiO<sub>2</sub> c3 zeigten einen signifikanten Abfall der Zellviabilität.

### 3.2 Apoptose-Marker Bax und Caspase 3

Nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml wurde mit der PCR die Menge an Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) gemessen, die jeweils für die Proteine Bax und Caspase-3 codierte. Im Western Blot wurde die Menge der Proteine Bax und Caspase-3 bestimmt. Dabei wurde bei Caspase-3 zwischen dem großen inaktiven Protein und den beiden kleinen aktiven Proteinen als Spaltprodukt des großen Proteins unterschieden. In der PCR deutete ein Anstieg der Apoptose-Marker Bax und Caspase-3 auf eine Apoptose hin. Im Western Blot deutete ein Anstieg von Bax sowie ein Abfall der inaktiven Caspase-3 in Kombination mit einem Anstieg der aktiven Caspase-3 auf eine Apoptose hin.

Die einzelnen Messwerte eines Versuchs wurden auf die jeweilige Kontrolle 1 (K1) des Versuchs normiert. Da es in jedem Versuch zwei Kontrollen gab, wurde die erste Kontrolle (Kontrolle 1) standardmäßig für die Normierung gewählt und als einzige Kontrolle mit in die Graphiken aufgenommen. Somit betrug die Genexpression bzw. Proteinexpression der Kontrolle in jedem Versuch 1 (= 100%). Daraus ergab sich für die Kontrollen immer ein Mittelwert von 1 (= 100%) und eine Standardabweichung von 0 (= 0%).

### 3.2.1 Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Die PCR Ergebnisse wurden mit der StepOne Software ausgewertet. Dabei wurden die Proben alle auf die Kontrolle 1 (K1) normiert. Zudem wurde jede Bax und Caspase-3 Messung auf eine Kontrolle mit CANX normiert. Für jede einzelne Probe und jedes einzelne Zielgen wurden drei Einzelmessungen durchgeführt. Die Standardabweichung dieser Messungen wurde mit  $\Delta C_T$  SE bezeichnet. Es wurde darauf geachtet, dass die  $\Delta C_T$  SE Werte unter 0,2 lagen. Um dies zu erreichen, wurden bei den drei Einzelmessungen einer Probe extreme Messausreißer von den Berechnungen ausgeschlossen. Dies war nicht immer möglich. Es wurden bei insgesamt drei Proben ein  $\Delta C_T$  SE Wert bis zu 0,28 toleriert. Bei einer Messung wurde nur bei einer der Dreifachmessungen ein Signal detektiert. Hierbei entfiel dann die  $\Delta C_T$  SE.

Bei der Zelllinie Hep G2 hat die PCR auch nach mehrfacher Durchführung keine Ergebnisse erbracht. Mittels NanoDrop konnte zwar im Zwischenschritt die Herstellung von cDNA nachgewiesen werden, es kam jedoch in der PCR zu keinem Signalanstieg. Aus Zeit und Kapazitätsgründen wurde der Versuch nicht erneut durchgeführt.

Bei der Zelllinie cerebEND zeigten sich für die Bax Genexpression keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich eine Bax Genexpression von  $95\% \pm 9\%$ . Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Genexpression von  $96\% \pm 10\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ergab sich eine Bax Genexpression von  $113\% \pm 12\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Bax Genexpression von  $91\% \pm 6\%$ . Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Bax Genexpression von  $111\% \pm 20\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml ergab sich eine deutlich erhöhte, aber statistisch nicht signifikante Bax Genexpression mit  $238\% \pm 161\%$ . Hierbei kam es zu einer sehr hohen Messung in einer PCR, die sich auch in der hohen Standardabweichung widerspiegelt. In dieser PCR kam für Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml der Signalanstieg für Bax vor allen anderen Proben und der Signalanstieg für CANX verspätet nach den anderen Proben. Es könnte sich somit um einen technischen Messfehler handeln. Die Durchführung weiterer PCRs könnte darüber Aufschluss geben. Die folgende Abbildung 11 zeigt die Genexpression von Bax für die Zelllinie cerebEND.

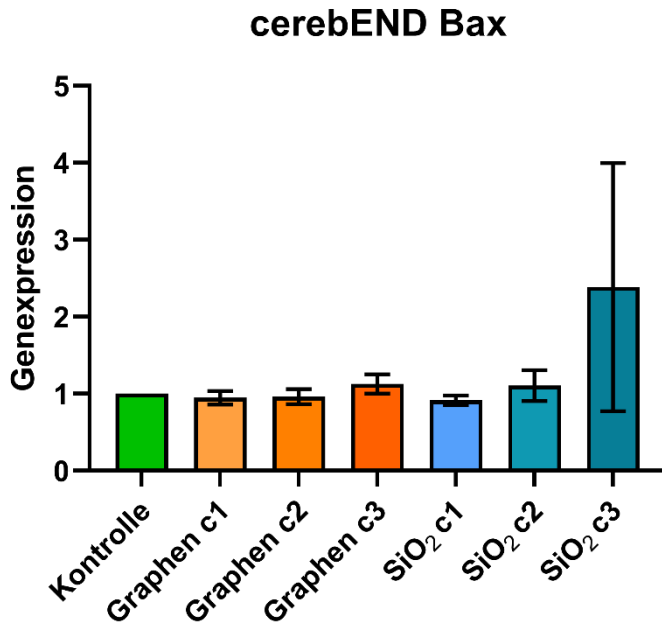


Abbildung 11: Bax-Genexpression der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Bei der Zelllinie cerebEND zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Caspase-3 Genexpression von 95% ± 10%. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Caspase-3 Genexpression von 94% ± 12%. Und für eine Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 104% ± 12%. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Caspase-3 Genexpression von 91% ± 8%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich sogar eine statistisch signifikante Abnahme der Caspase-3 Genexpression mit 62% ± 14%. Und für eine Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 99% ± 28%. Bis auf das Ergebnis von Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml gab es keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Die Ergebnisse der Caspase-3 Genexpression der Zelllinie cerebEND sind in der folgenden Abbildung 12 dargestellt.

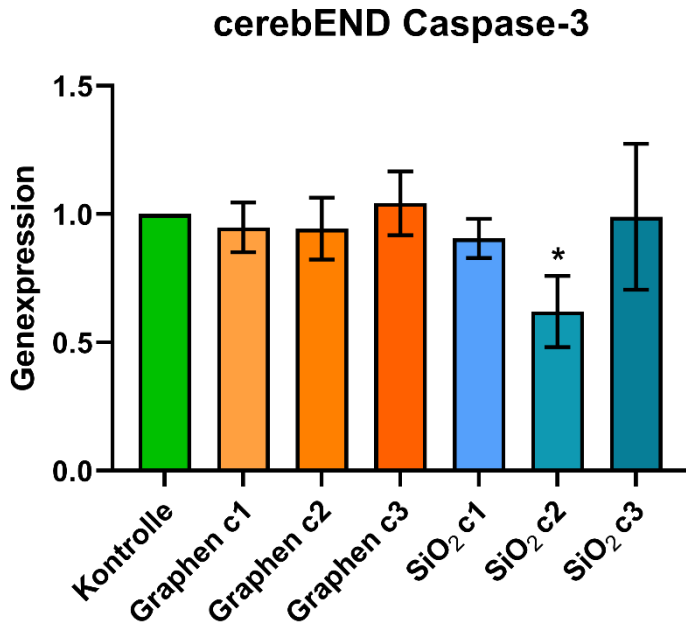


Abbildung 12: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Bande zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression.

Die Zelllinie Caco-2 zeigte für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Bax Genexpression von 90% ± 10%. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Genexpression von 94% ± 11%. Und für eine Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Genexpression von 80% ± 11%. Bei Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich eine Bax Genexpression von 96% ± 9%. Für eine Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Genexpression von 104% ± 8%. Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall der Bax Genexpression auf 69% ± 11%. Bis auf das Ergebnis von Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml gab es keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Die Ergebnisse der Bax Genexpression der Zelllinie Caco-2 sind in der folgenden Abbildung 13 dargestellt.



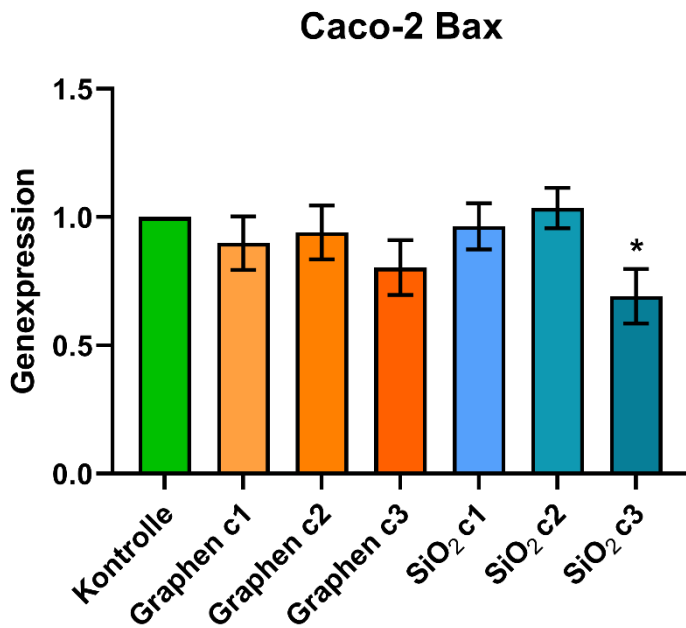


Abbildung 13: Bax-Genexpression der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression.

Bei der Zelllinie Caco-2 zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Caspase-3 Genexpression von 104% ± 11%. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml lag die Caspase-3 Genexpression bei 105% ± 7%. Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 91% ± 5%. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 98% ± 5%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Caspase-3 Genexpression von 102% ± 3%. Und für eine Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml ergab sich ein statistisch signifikanter Abfall der Caspase-3 Genexpression auf 62% ± 5%. Bis auf das Ergebnis von Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml gab es keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Die Ergebnisse der Caspase-3 Genexpression der Zelllinie Caco-2 sind in der folgenden Abbildung 14 dargestellt.

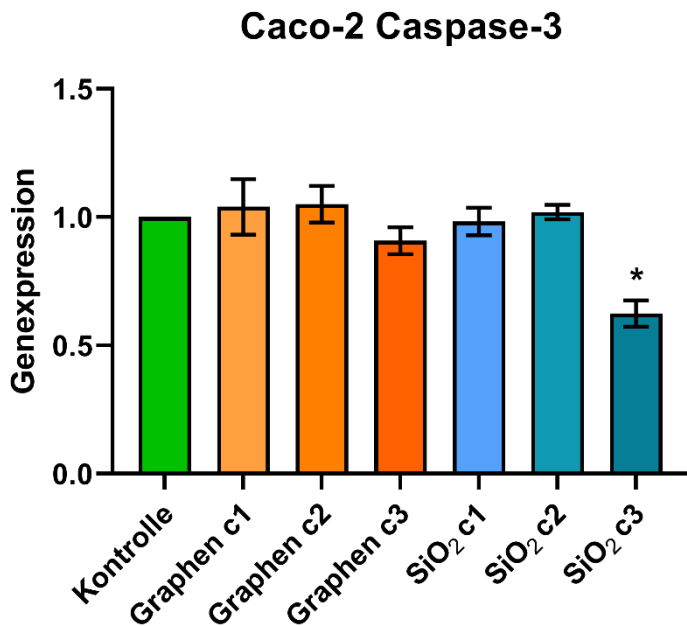


Abbildung 14: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigt eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression.

Die Zelllinie HEK-293 zeigte bei einer Graphen Konzentration von 0,01 mg/ml eine statistisch signifikante Abnahme der Bax Genexpression auf  $81\% \pm 1\%$ . Dahingen ergab sich bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ein statistisch signifikanter Anstieg der Bax Genexpression auf  $117\% \pm 6\%$ . Bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung mit einer Bax Genexpression von  $98\% \pm 3\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung mit einer Bax Genexpression mit  $101\% \pm 7\%$ . Bei einer Siliciundioxid Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich mit einer Bax Genexpression von  $85\% \pm 14\%$  ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung. Doch bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall der Bax Genexpression auf  $51\% \pm 6\%$ . In der folgenden Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Bax Genexpression der Zelllinie HEK-293 dargestellt.

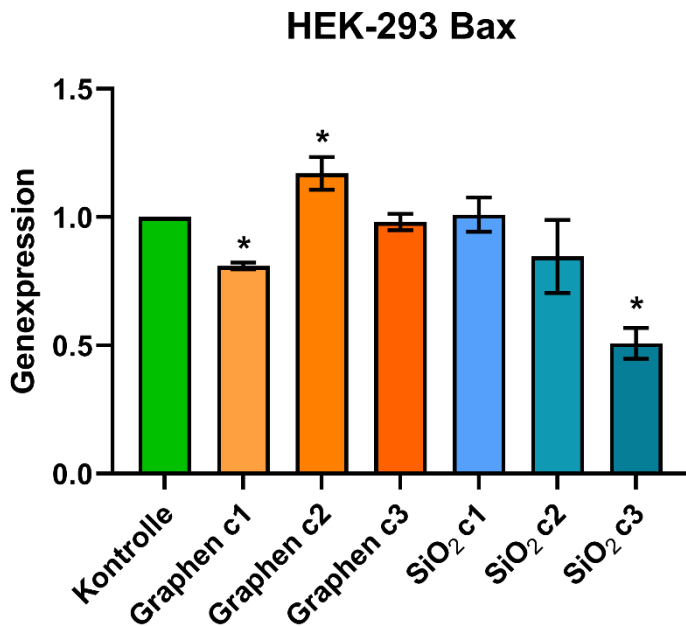


Abbildung 15: Bax-Genexpression der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierten Blaken zeigten eine statistisch signifikante Minderung bzw. Erhöhung der Genexpression.

Die Zelllinie HEK-293 zeigte für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Caspase-3 Genexpression von 103% ± 8%. Bei Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 106% ± 6%. Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ergab sich eine Caspase-3 Genexpression von 100% ± 10%. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Caspase-3 Genexpression von 104% ± 6%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Konzentration von 95% ± 2%. Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall der Caspase-3 Genexpression auf 68% ± 7%. Bis auf das Ergebnis von Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml gab es keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Die Ergebnisse der Caspase-3 Genexpression der Zelllinie HEK-293 sind in der folgenden Abbildung 16 dargestellt.

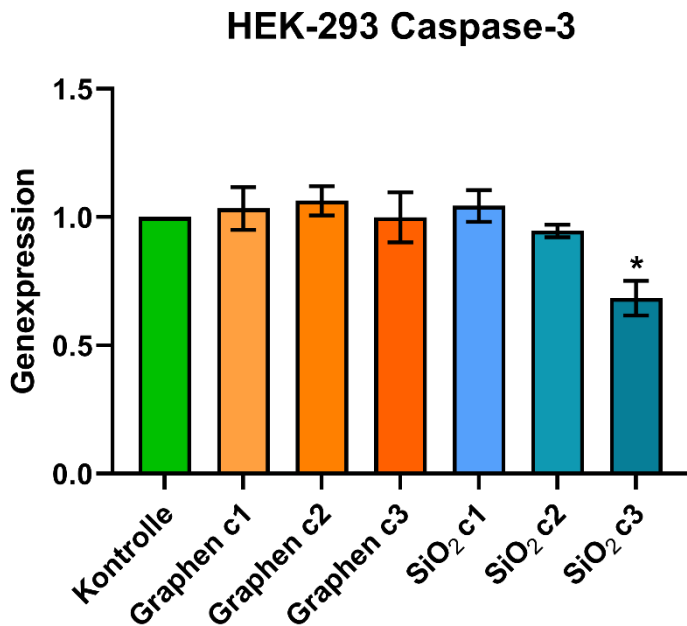


Abbildung 16: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Proteinexpression.

Die H441 Zelllinien zeigte für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Bax Genexpression von 90% ± 15%. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Genexpression von 105% ± 4%. Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Genexpression von 87% ± 20%. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Bax Genexpression von 96% ± 4%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Bax Genexpression von 110% ± 10%. Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Bax Genexpression auf 54% ± 42%. Hierbei kam es zu einer sehr geringen Messung in einer PCR, die sich auch in der hohen Standardabweichung widerspiegelt. In dieser PCR kam für Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml der Signalanstieg für Bax verspätet nach allen anderen Proben und der Signalanstieg für CANX verfrüht vor den anderen Proben. Es könnte sich somit um einen technischen Messfehler handeln. Die Durchführung weiterer PCRs könnte darüber Aufschluss geben. Bis auf das Ergebnis von Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml gab es keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Die Ergebnisse der Bax Genexpression der Zelllinie H441 sind in der folgenden Abbildung 17 dargestellt.

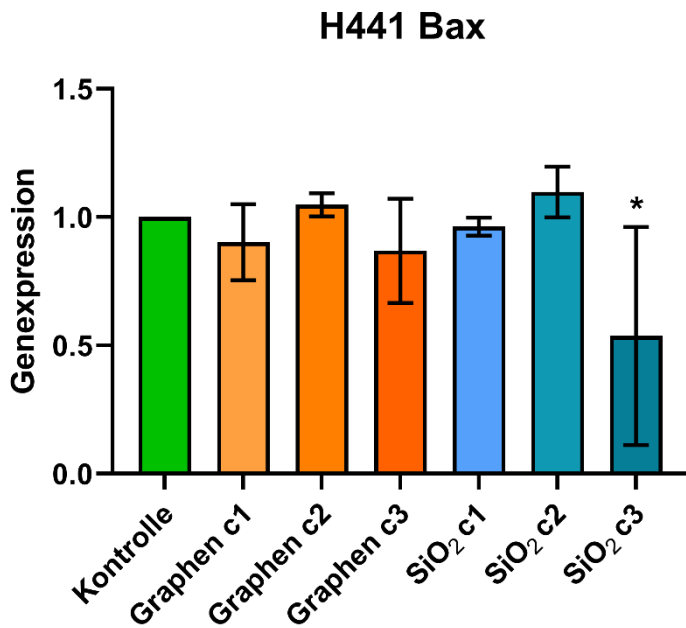


Abbildung 17: Bax-Genexpression der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression.

Bei der H441 Zelllinie zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Caspase-3 Genexpression von 105% ± 21%. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Caspase-3 Genexpression von 109% ± 6%. Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 109% ± 10%. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Caspase-3 Genexpression von 112% ± 13%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 108% ± 10%. Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Caspase-3 Genexpression von 76% ± 14%. Keines dieser Ergebnisse zeigte eine statistisch signifikante Abweichung von der Kontrolle. Die Ergebnisse der Caspase-3 Genexpression der Zelllinie H441 sind in der folgenden Abbildung 18 dargestellt.

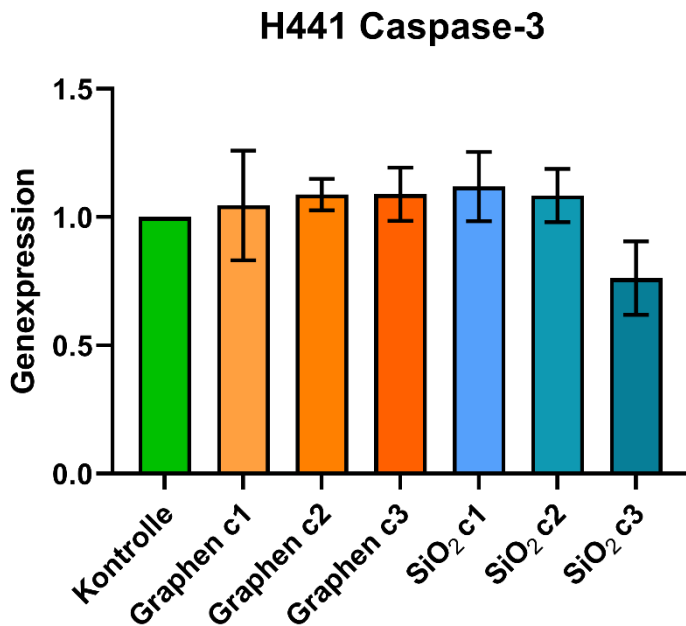


Abbildung 18: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

### 3.2.2 Western Blot

Mit dem Imager wurden die mit Antikörpern inkubierten PVDF-Membranen abgelichtet. Ein Bandenmuster wurde sichtbar. In den Abbildungen 19, 22, 25, 28 und 31 sind Bandenmuster für alle verwendeten Zelllinien abgebildet. Die Proteine Bax, Caspase-3 und  $\beta$ -Aktin befanden sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe auf unterschiedlichen Höhen auf der Membran. Mit der bunten Marker-Bande konnten Rückschlüsse auf die Proteingröße der abgelichteten Bande und somit das nachgewiesene Protein gezogen werden.  $\beta$ -Aktin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa zeichnete sich am höchsten auf der PVDF-Membran ab, zwischen den beiden blauen Markierung für 35 und 55 kDa. Caspase-3 mit einem Molekulargewicht von 35 kDa zeichnete sich etwas tiefer ab, auf Höhe der blauen Markierung für 35 kDa. Für Caspase-3 zeigten sich bei keinem der Versuche Banden bei 17 und 19 kDa, welche einer aktivierten Caspase-3 entsprechen würden, welche durch Aufspaltung der großen inaktiven Caspase-3 in zwei kleinere Proteine entstanden wäre. Bax mit einem Molekulargewicht von 20 kDa zeichnete sich am tiefsten auf der PVDF-Membran ab, zwischen der blauen Markierung für 15 kDa und der roten Markierung für 25 kDa.

Mit dem Programm ImageJ wurden die Bandenmuster ausgemessen. Die einzelnen Messungen für die Nanopartikel auf einer Membran wurden durch die jeweilige Messung

für die Kontrolle geteilt. Hierfür wurde immer die Kontrolle K1 gewählt. Anschließend wurden die Messwerte noch auf  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein normiert.

Die folgende Abbildung 19 zeigt das Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie cerebEND für die Proteine  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid.



Abbildung 19: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie cerebEND mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar.

Die Zelllinie cerebEND zeigte für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Bax Proteinexpression von  $79\% \pm 31\%$ . Für Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $84\% \pm 25\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $80\% \pm 46\%$ . Bei Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $69\% \pm 42\%$ . Für eine Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $98\% \pm 30\%$ . Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $65\% \pm 12\%$ . Keines der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Bax Proteinexpression der Zelllinie cerebEND sind in der folgenden Abbildung 20 dargestellt.

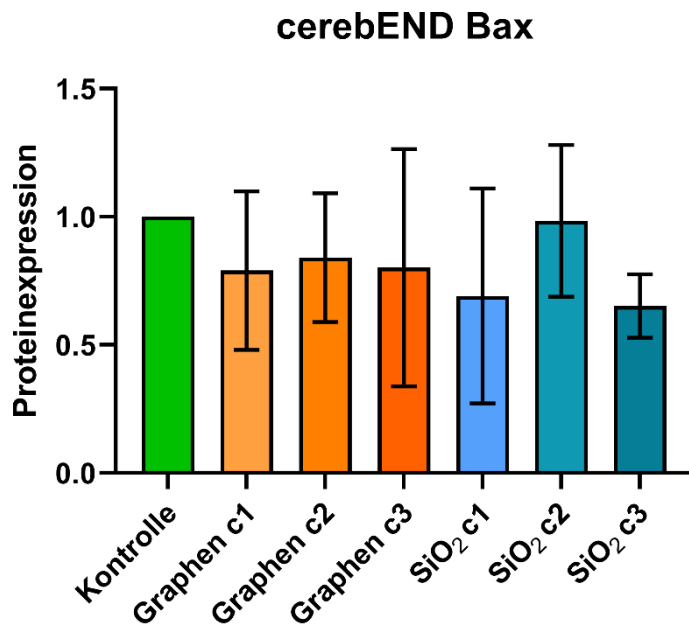


Abbildung 20: Bax-Proteinexpression der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Bei der Zelllinien cerebEND zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 89% ± 32%. Für Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 91% ± 28%. Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 81% ± 39%. Bei Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktive Caspase-3 von 76% ± 40%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 92% ± 29%. Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 77% ± 22%. Keines der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 der Zelllinie cerebEND sind in der folgenden Abbildung 21 dargestellt.



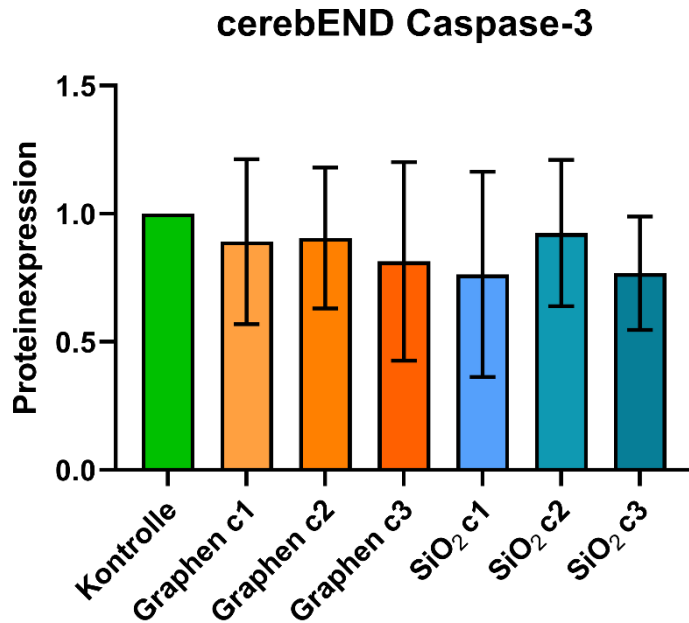


Abbildung 21: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Die folgende Abbildung 22 zeigt das Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie Caco-2 für die Proteine  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid.

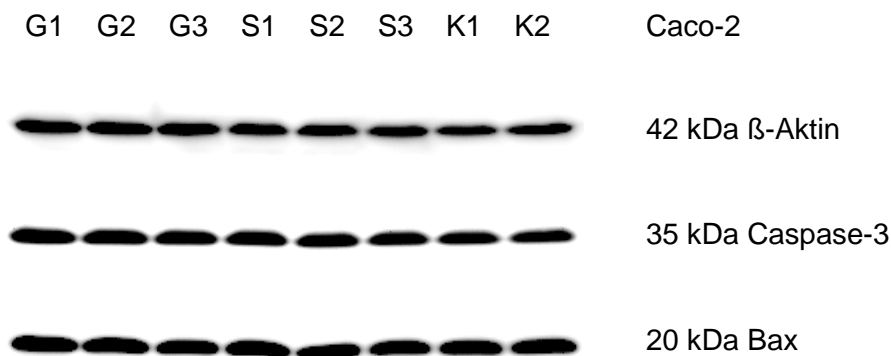


Abbildung 22: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie Caco-2 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar.

Bei der Zelllinie Caco-2 zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Bax Proteinexpression von  $77\% \pm 13\%$ . Für eine Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $84\% \pm 19\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $79\% \pm 9\%$ . Bei Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Bax Proteinexpression von  $91\% \pm 21\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Proteinexpression von  $92\% \pm 18\%$ . Und für eine Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml ergab sich eine Bax Proteinexpression von  $81\% \pm 8\%$ . Keines der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Bax Proteinexpression der Zelllinie Caco-2 sind in der folgenden Abbildung 23 dargestellt.

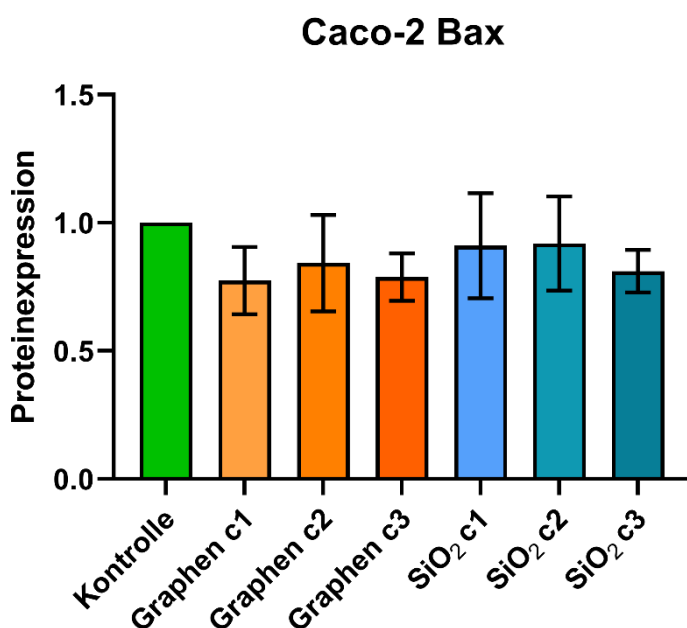


Abbildung 23: Bax-Proteinexpression der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Bei der Zelllinie Caco-2 zeigte sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $87\% \pm 15\%$ . Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $90\% \pm 18\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $85\% \pm 10\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $92\% \pm 14\%$ . Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $95\% \pm 10\%$ . Und für Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml ergab sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $87\% \pm 8\%$ . Keines

der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 der Zelllinie Caco-2 sind in der folgenden Abbildung 24 dargestellt.

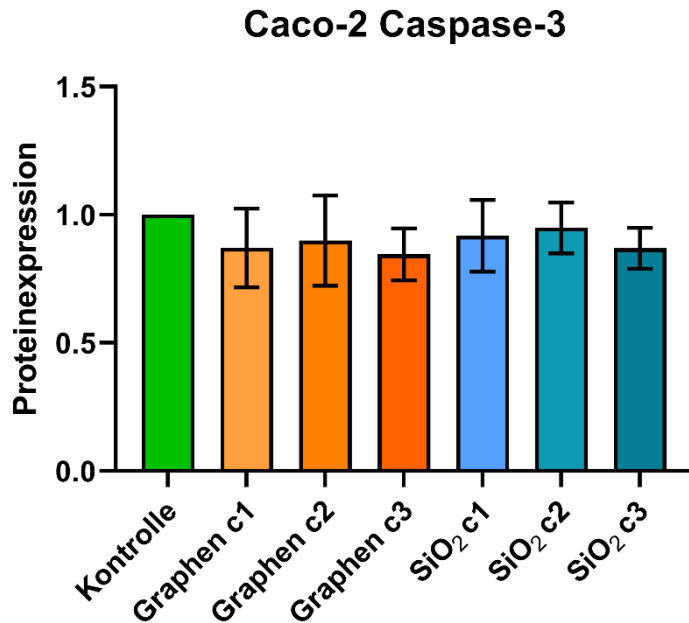


Abbildung 24: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Die folgende Abbildung 25 zeigt das Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie Hep G2 für die Proteine  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid.

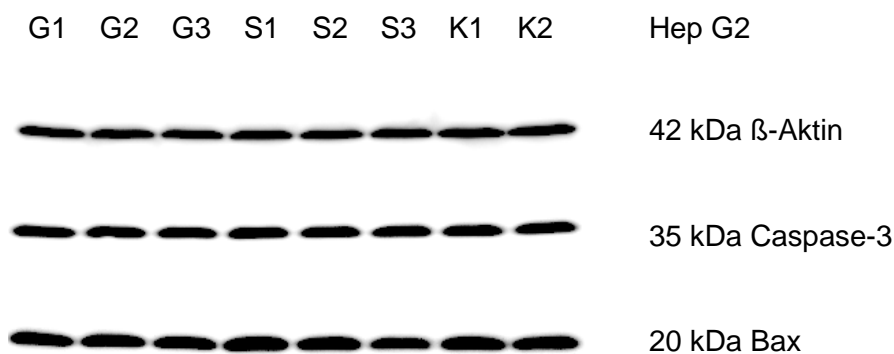


Abbildung 25: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie Hep G2 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1, S2, S3 (Siliciumdioxid) und K1, K2 (Kontrolle).

S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar.

Die Zelllinie Hep G2 zeigte für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Bax Proteinexpression von  $83\% \pm 17\%$ . Für eine Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $83\% \pm 17\%$ . Und für eine Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $92\% \pm 30\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Bax Proteinexpression von  $103\% \pm 16\%$ . Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Proteinexpression von  $108\% \pm 20\%$ . Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $93\% \pm 18\%$ . Keines der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Bax Proteinexpression der Zelllinie Hep G2 sind in der folgenden Abbildung 26 dargestellt.

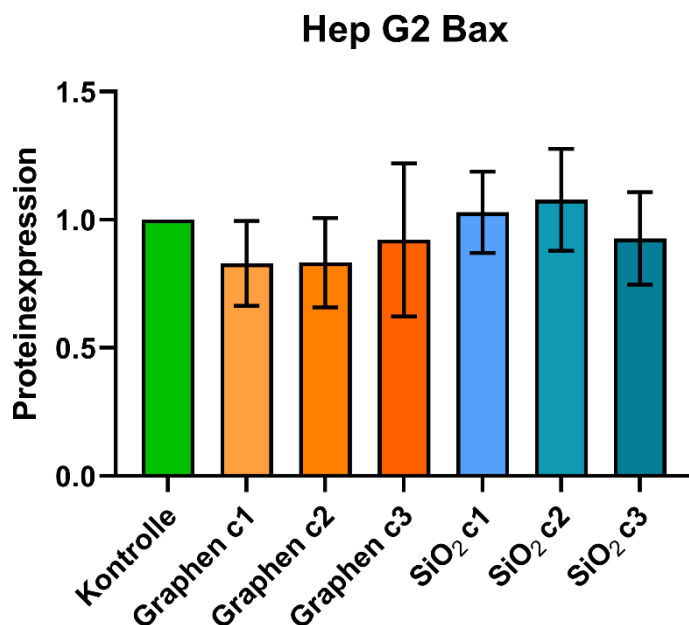


Abbildung 26: Bax-Proteinexpression der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Die Zelllinie Hep G2 zeigte für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $100\% \pm 16\%$ . Für eine Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $95\% \pm 9\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $103\% \pm 20\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration

0,01 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $108\% \pm 16\%$ . Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $106\% \pm 21\%$ . Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $109\% \pm 20\%$ . Keines der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 der Zelllinie Hep G2 sind in der folgenden Abbildung 27 dargestellt.

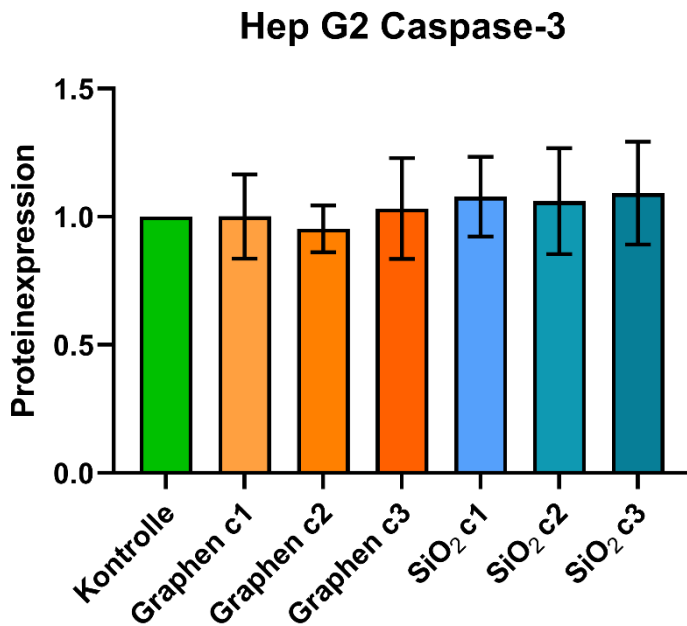


Abbildung 27: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Die folgende Abbildung 28 zeigt das Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie HEK-293 für die Proteine  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid.



Abbildung 28: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie HEK-293 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar.

Bei der Zelllinie HEK-293 ergab sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml mit einer Bax Proteinexpression von  $81\% \pm 5\%$  ein statistisch signifikanter Abfall von der Kontrolle. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich mit einer Bax Proteinexpression von  $93\% \pm 4\%$  keine statistisch signifikante Veränderung. Ebenso bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich mit einer Bax Proteinexpression von  $88\% \pm 4\%$  keine statistisch signifikante Abweichung von der Kontrolle. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich mit  $89\% \pm 5\%$  keine statistisch signifikante Veränderung. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Abfall mit einer Bax Proteinexpression von  $85\% \pm 9\%$ . Ebenso zeigte sich bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml ein statistisch signifikanter Abfall der Bax Proteinexpression mit  $73\% \pm 7\%$ . Die Ergebnisse der Bax Proteinexpression der Zelllinie HEK-293 sind in der folgenden Abbildung 29 dargestellt.

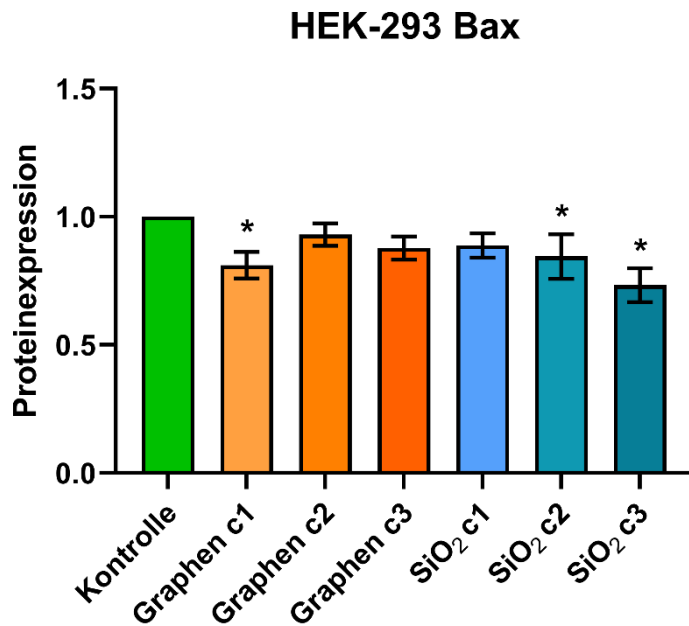


Abbildung 29: Bax-Proteinexpression der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierten Blaken zeigten eine statistisch signifikante Minderung der Proteinexpression.

Bei der Zelllinie HEK-293 ergab sich für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 89% ± 11%. Für eine Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 91% ± 15%. Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ergab sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 97% ± 13%. Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 104% ± 14%. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 98% ± 14%. Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von 95% ± 8%. Keines der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 der Zelllinie HEK-293 sind in der folgenden Abbildung 30 dargestellt.

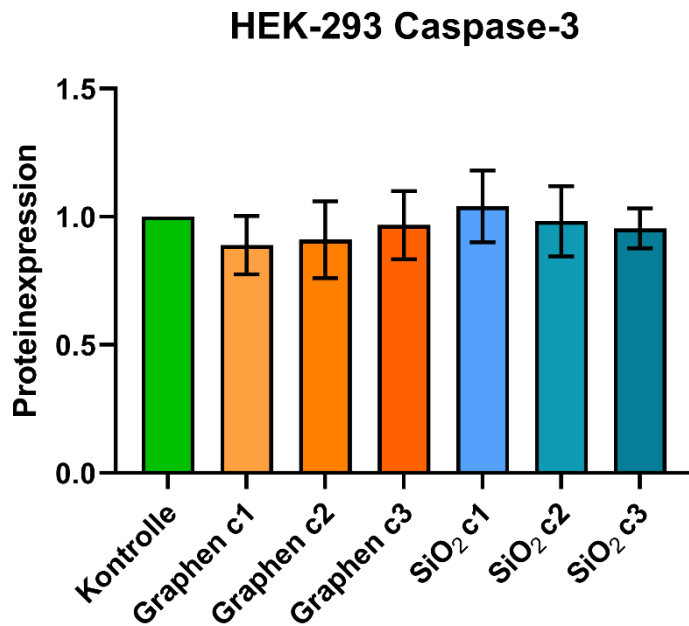


Abbildung 30: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Die folgende Abbildung 31 zeigt das Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie H441 für die Proteine  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid.



Abbildung 31: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie H441 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar.



Die Zelllinien H441 zeigte für Graphen einer Konzentration von 0,01 mg/ml eine Bax Proteinexpression von  $98\% \pm 4\%$ . Für eine Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Proteinexpression von  $99\% \pm 14\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $89\% \pm 11\%$ . Für Siliciumdioxid einer Konzentration von 0,01 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $106\% \pm 22\%$ . Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml ergab sich eine Bax Proteinexpression von  $108\% \pm 13\%$ . Und bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Bax Proteinexpression von  $83\% \pm 5\%$ . Keines der Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Bax Proteinexpression der Zelllinie H441 sind in der folgenden Abbildung 32 dargestellt.

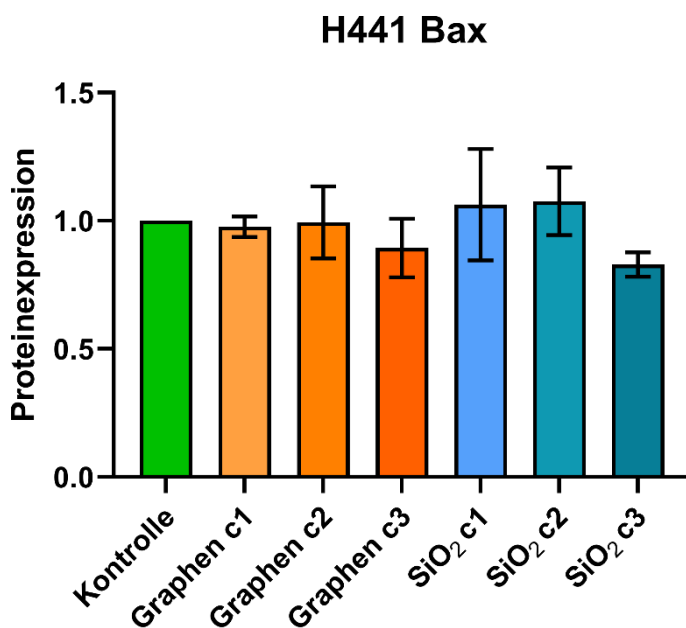


Abbildung 32: Bax-Proteinexpression der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

Die Zelllinie H441 zeigte für Graphen einer Konzentration von 0,01 mg/ml eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $99\% \pm 13\%$ . Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $94\% \pm 11\%$ . Und bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml ergab sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $101\% \pm 6\%$ . Für Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml ergab sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $99\% \pm 13\%$ . Bei Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $98\% \pm 5\%$ . Und für eine Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 von  $98\% \pm 3\%$ . Keines der

Ergebnisse wurde statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Proteinexpression der inaktiven Caspase-3 der Zelllinie H441 sind in der folgenden Abbildung 33 dargestellt.

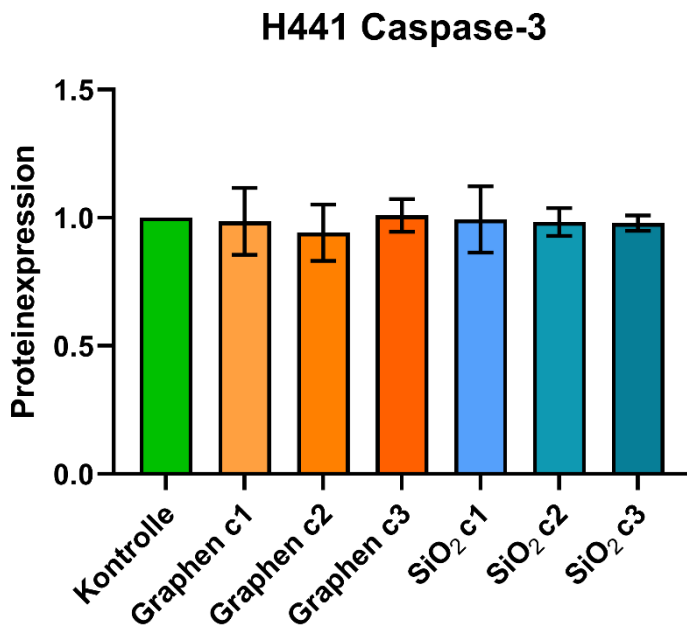


Abbildung 33: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle.

#### 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war eine Untersuchung der Toxizität der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid im Zellmodell. Dazu wurden die Zellviabilität und die Expression der Apoptose-Marker Bax und Caspase-3 auf Gen- und Protein-Ebene gemessen. Die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid wurden mit Basismedium jeweils in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml für 24 Stunden inkubiert. Verwendet wurden die Zelllinien cerebEND (Zerebrale Endothelzellen), Caco-2 (Kolonzellen), Hep G2 (Leberzellen), HEK-293 (Nierenzellen) und H441 (Lungenzellen).

Zur Untersuchung der Zellviabilität wurden Tests auf Basis von Adsorptionsmessung und auf Lumineszenzmessung durchgeführt. Auf Adsorptionsmessung beruhten der EZ4U-, der MTT- und der LDH-Test. Dahingegen basierte der CellTiter-Glo-Assay auf Lumineszenzmessung.

Bei den Adsorptionstests werden die Testreagenzien von den Zellen metabolisiert. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag. Je mehr Zellen nach der Inkubation mit den Nanopartikeln noch am Leben sind, desto mehr des Testreagenz wird metabolisiert und desto stärker wird der Farbumschlag. Je stärker der Farbumschlag, desto höher fallen

die Messwerte der Adsorption aus. Das Problem bestand dabei in der Eigenfarbe der Nanopartikel. Das schwarze Graphen und das weiße Siliciumdioxid lagerten sich, während der 24-stündigen Inkubation, auf dem Zellrasen ab und beeinflussten durch ihre Eigenfarbe die Adsorptionsmessung.

Um das Problem der Interferenz der Nanopartikel zu umgehen und die Tests auf Basis von Adsorptionsmessung trotzdem anwenden zu können, wurden verschiedene Versuche zur Anpassung unternommen.

Ein Versuch des Spülens der Wells mit PBS nach abgelaufener 24-stündiger Inkubation entfernte einen Teil der abgelagerten Nanopartikel, aber bei weitem nicht alle. Die cerebEND Zelllinie vertrug das Spülen gut, es konnte sogar viermal gespült werden, ohne einen nennenswerten Zellverlust zu erleiden. Dabei waren die ersten beiden Spülvorgänge am effektivsten. Wurde bei den anderen Zelllinien mehr als zweimal gespült, gingen erhebliche Mengen an Zellen verloren. Deshalb wurde nur noch zweimal mit PBS gespült. Bei der Zelllinie HEK-293 ging auch durch zweimaliges Spülen mit PBS eine erhebliche Menge an Zellen verloren, sodass bei dieser Zelllinie ganz auf das Spülen mit PBS verzichtet wurde. Je nachdem wie gut sich die Nanopartikel beim Spülvorgang von den Zellen lösten, kamen die Ergebnisse der tatsächlichen Zellviabilität vermutlich näher oder lagen ferner. Dies stellte somit keine perfekte Lösung dar, wurde aber bei allen Versuchen durchgeführt, um bessere Ergebnisse zu erzielen.

Ein weiterer Versuch zur Anpassung des Versuchs wurde unternommen, indem nach Inkubation mit den Testreagenzien, somit nach abgeschlossenem Farbumschlag, 100 µl pro Well auf eine neue 96-Well-Platte übertragen wurden. Die Hoffnung war, dass die abgelagerten Nanopartikel auf dem Boden der Wells der alten 96-Well-Platte verbleiben würden und auf der neuen Platte eine von Nanopartikeln ungestörte Adsorptionsmessung durchgeführt werden könnte. Es wurden dabei jedoch immer auch Nanopartikel mit auf die neue Platte verschleppt. Es kam teils zu extrem hohen Standardabweichungen und teilweise auch zu negativen Werten für die Zellviabilität, sodass dieser Ansatz wieder verlassen wurde.

Um den Einfluss der Nanopartikel auf die Adsorptionsmessung aufzuzeigen, wurden 96-Well-Platten mit cerebEND Zellen für 24 Stunden mit den Nanopartikeln in farblosem Medium inkubiert. Es wurden keine Testreagenzien hinzugegeben. Anschließend wurde die Adsorption gemessen und auf eine Kontrolle mit farblosem Basismedium normiert. Die Adsorption war für Graphen bei einer Wellenlänge von 540 nm ohne Referenzwellenlänge bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml um den Faktor 1,4, bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml um den Faktor 5,3 und bei einer Konzentration von 1 mg/ml um den Faktor 51,7 erhöht. Für Siliciumdioxid ergab sich bei einer Wellenlänge von 540 nm ohne

Referenzwellenlänge für eine Konzentration von 0,01 mg/ml eine 0,9-fache, für eine Konzentration von 0,1 mg/ml eine 2,3-fache und für 1 mg/ml eine 19,9-fache Adsorption im Vergleich zur Kontrolle mit farblosem Basismedium.

Wurde zusätzlich zur Wellenlänge von 540 nm eine Referenzwellenlänge von 620 nm gewählt, kam es bei Graphen zu einem starken Abfall der Adsorptionswerte, die sogar geringer als die Kontrolle gemessen wurden, wohingegen die Adsorptionswerte für Siliciumdioxid kaum Unterschiede zeigten. Dies legt nahe, dass eine Referenzwellenlänge von 620 nm besser dazu geeignet ist die schwarzen Rückstände des Graphens, als die weißen Rückstände des Siliciumdioxids herauszurechnen. Für Graphen der Konzentrationen 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml könnten die Messwerte dadurch den wahren Werten sehr nahe kommen. Bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml kam es allerdings durch die Referenzwellenlänge teilweise zu negativen Werten und einer sehr großen Streuung bei der Adsorptionsmessung. Sodass vor allem bei dieser Konzentration bei Verwendung einer Referenzwellenlänge die Adsorptionswerte falsch niedrig gemessen werden könnten.

Nach dieser ersten Messung der Adsorption wurden die Zellen viermal mit PBS gespült. Anschließend wurde die Adsorption erneut gemessen. Die Messwerte der Nanopartikel bei 540nm ohne Referenzwellenlänge waren im Vergleich zur Kontrolle immer noch um ein Vielfaches erhöht, jedoch waren sie geringer erhöht als ohne Spülen.

Somit erhöhten die abgelagerten Nanopartikel, vor allem in höheren Konzentrationen, die Messwerte der Adsorption erheblich. Die teilweise signifikante Erhöhung der Zellviabilität nach Inkubation mit den Nanopartikeln im EZ4U-Test beruht daher vermutlich auf der Interferenz der Nanopartikel und nicht auf einem gesteigerten Zellwachstum. Zudem könnte durch die Interferenz ein Rückgang der Zellzahl und somit eine toxische Wirkung der Nanopartikel verschleiert werden. Diese Vermutung wird auch durch das mikroskopische Bild gestützt. Hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein vermehrtes Zellwachstum bei den Nanopartikeln. In höheren Konzentrationen der Nanopartikel waren mikroskopisch teilweise neue Aussparungen im Zellrasen sichtbar.

Aus diesem Grund wurden nach den Vorversuchen der LDH-Test und der MTT-Test wieder verlassen. Nur der EZ4U-Test wurde als einziger Adsorptionstest beibehalten. Die Aussagekraft der EZ4U-Ergebnisse bleibt jedoch anzuzweifeln, da eine Interferenz der Nanopartikel mit der Messung trotz der getroffenen Maßnahmen nicht gänzlich eliminiert werden konnte. Nach den Schwierigkeiten mit den auf Adsorptionsmessung beruhenden Tests, wurde der CellTiter-Glo Assay als Alternative eingeführt. Da dieser Test auf Lumineszenz-Messung beruht, war das Vorhandensein und die Farbe der Nanopartikel irrelevant für die Messung. Das Testreagenz wurde von den Zellen metabolisiert

und damit zur Lumineszenz gebracht. Je mehr Zellen nach der 24-stündigen Inkubation mit den Nanopartikeln noch am Leben waren, desto stärker war die Lumineszenz.

Obwohl manche der EZ4U-Ergebnisse mit den Ergebnissen des CellTiter-Glo Assay übereinstimmten, gab es zum Teil auch gegensätzliche Ergebnisse. In diesen Fällen sollten die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay als die verlässlicheren Ergebnisse eingestuft werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellviabilitätstests genauer dargestellt.

Für Graphen zeigten sich bei der Zelllinie cerebEND im CellTiter-Glo Assay keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellviabilität. Zu beobachten war allerdings eine leicht fallende Tendenz der Zellviabilität bei steigender Graphen Konzentration. Der im EZ4U-Test gezeigte signifikante Anstieg der Zellviabilität bei einer Graphen-Konzentration von 1 mg/ml wird interferenzbedingt als Fehlmessung gewertet.

Bei der Zelllinie Caco-2 zeigte Graphen im CellTiter-Glo Assay keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellviabilität. Die Zellviabilität der Caco-2 Zelllinie schien durch Graphen in den verwendeten Konzentrationen unbeeinträchtigt. Im EZ4U-Test kam es allerdings zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml. Dies könnte allerdings durch die Messung mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm bedingt sein. Lehrmessungen zeigten, dass bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml die Adsorption durch die Referenzwellenlänge zu sehr nach unten korrigiert wurde. Betrachtet man den Adsorptionswert für 1 mg/ml Graphen im EZ4U-Test ohne Referenzwellenlänge, ist der gemessene Wert im Vergleich zu der Kontrolle um den Faktor 4,7 erhöht. Von einem Anstieg der Zellviabilität kann in diesem Fall jedoch nicht ausgegangen werden, da Graphen in dieser Konzentration, ohne Referenzwellenlänge gemessen, die Adsorptionsmessung um ein Vielfaches falsch in die Höhe treibt.

Die Hep G2 Zelllinie zeigte im CellTiter-Glo Assay für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml eine nicht signifikant leicht erhöhte Zellviabilität. Bei steigenden Konzentrationen zeigte sich ein stetiger Rückgang der Zellviabilität. Die Zellviabilität war bei 1 mg/ml Graphen deutlich abgefallen, das Ergebnis wurde allerdings statistisch nicht signifikant. Der EZ4U-Test zeigte für 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml Graphen keine wesentlichen Veränderungen. Bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. Da dieser Trend auch im CellTiter-Glo Assay zu erkennen ist, könnte es sich hierbei um einen tatsächlichen Abfall der Zellviabilität handeln, und nicht um ein Ergebnis, das nur durch eine Überkorrektur bei der Messung mit der Referenzwellenlänge von 620 nm zustande gekommen ist.

Im CellTiter-Glo Assay der Zelllinie HEK-293 zeigte Graphen in den geringeren Konzentrationen keine wesentlichen Veränderungen der Zellviabilität. Bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml kam es dann zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. In diesem Fall kam der EZ4U-Test zu den gleichen Ergebnissen wie der CellTiter-Glo Assay.

Die Zelllinie H441 zeigte im CellTiter-Glo Assay für Graphen in den geringeren Konzentrationen keine wesentlichen Veränderungen der Zellviabilität. Bei Graphen der Konzentration 1 mg/ml kam es dann zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. Im EZ4U-Test kam es bei einer Graphen Konzentration von 0,01 mg/ml ebenfalls zu keiner wesentlichen Veränderung der Zellviabilität. Jedoch zeigte hier eine Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml eine statistisch signifikante Abnahme der Zellviabilität. Bei 1 mg/ml Graphen kam es zu einer noch stärkeren und ebenfalls statistisch signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Ob der Abfall der Zellviabilität im EZ4U-Test bei 0,1 mg/ml Graphen tatsächlich stimmt bleibt anzuzweifeln, da der CellTiter-Glo Assay hier keinen Einbruch der Zellviabilität verzeichnet und das Ergebnis auch durch eine Überkorrektur durch die Referenzwellenlänge von 620 nm erklärt werden kann.

Betrachtet man nun die Zellviabilität nach Inkubation mit Siliciumdioxid kommt man zu den folgenden Ergebnissen. Die Zelllinie cerebEND zeigte im CellTiter-Glo Assay für Siliciumdioxid in den geringeren Konzentrationen keine statistisch signifikanten Abweichungen der Zellviabilität. Bei 1 mg/ml Siliciumdioxid kam es dann zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. Im EZ4U-Test kam es für 0,01 mg/ml Siliciumdioxid zu einem ähnlichen Ergebnis wie im CellTiter-Glo Assay. Bei 0,1 mg/ml Siliciumdioxid kam es allerdings zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität, der vermutlich auf eine Interferenz der Nanopartikel mit der Messung und nicht auf ein tatsächlich vermehrtes Zellwachstum zurückzuführen ist. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml kam es im EZ4U-Test zu einem deutlichen, aber statistisch nicht signifikanten Abfall der Zellviabilität, was mit dem Ergebnis des CellTiter-Glo Assay vereinbar ist.

Die Zelllinie Caco-2 zeigte für Siliciumdioxid in den verwendeten Konzentrationen keine statistisch signifikanten Veränderungen von der Kontrolle. Bei steigender Siliciumdioxid Konzentration fällt die Zellviabilität allerdings etwas, aber nur unwesentlich, ab. Der EZ4U-Test erbrachte hiervon abweichende Ergebnisse. Es kam bei den geringeren Konzentrationen zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Zellviabilität, die Interferenzbedingt allerdings als Fehlmessung gewertet wird. Für 1 mg/ml Siliciumdioxid zeigte sich im EZ4U-Test analog zum CellTiter-Glo Assay keine statistisch signifikante Veränderung der Zellviabilität.

Siliciumdioxid zeigte bei der Zelllinie Hep G2 im CellTiter-Glo Assay in den geringeren Konzentrationen keine wesentlichen Abweichungen der Zellviabilität. Bei 1 mg/ml Siliciumdioxid kam es zu einem deutlichen, aber statistisch nicht signifikanten Abfall der Zellviabilität. Im EZ4U-Test zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen. Der leichte Anstieg der Zellviabilität bei 1 mg/ml Siliciumdioxid ist vermutlich interferenzbedingt.

Die Zelllinien HEK-293 zeigte im CellTiter-Glo Assay für Siliciumdioxid in den geringeren Konzentrationen keine wesentlichen Abweichungen der Zellviabilität. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml kam es dann zu einem starken statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. Der EZ4U-Test kam zu ähnlichen Ergebnissen. Die geringeren Siliciumdioxid Konzentrationen zeigten hier ebenfalls keine wesentlichen Abweichungen von der Kontrolle. Bei 1 mg/ml Siliciumdioxid kam es zu einem Abfall der Zellviabilität, der aber statistisch nicht signifikant wurde. Da durch die Interferenz des Siliciumdioxids die Zellviabilität tendenzmäßig zu hoch gemessen wird, könnte hier der tatsächliche Abfall der Zellviabilität auch höher sein.

Im CellTiter-Glo Assay der Zelllinie H441 zeigten sich für Siliciumdioxid in den geringeren Konzentrationen keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellviabilität. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml kam es dann zu einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. Vergleichend kam es im EZ4U-Test zu den gleichen Ergebnissen.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass Graphen ab einer Konzentration von 1 mg/ml auf die Zelllinien HEK-293 und H441 mit einem statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität eine toxische Wirkung zeigt. Bei den Zelllinien cerebEND und Hep G2 kam es zwar zu keinem statistisch signifikanten aber doch einem deutlichen Abfall der Zellviabilität, sodass auch hier eine toxische Wirkung ab einer Konzentration von 1 mg/ml Graphen vermutet werden kann. Eine höhere Fallzahl an Versuchen könnte darüber genauer Aufschluss geben. Einzig die Zelllinie Caco-2 zeigte bei 1 mg/ml Graphen keine Abnahme der Zellviabilität. Bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml oder geringer, konnte nach 24-stündiger Inkubation kein toxischer Effekt bei den untersuchten Zelllinien beobachtet werden.

Ähnlich verhielt es sich bei Siliciumdioxid. Eine Konzentration von 1 mg/ml bewirkte bei den Zelllinien cerebEND, HEK-293 und H441 einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität und somit eine toxische Wirkung. Die Hep G2 Zellen zeigten bei 1 mg/ml Siliciumdioxid einen deutlichen, aber statistisch nicht signifikanten Abfall der Zellviabilität. Hier kann eine toxische Wirkung vermutet werden und könnte durch eine höhere Fallzahl an Versuchen noch genauer abgeklärt werden. Die Zelllinie Caco-2 zeigte sich

auch hier unbeeindruckt und zeigte auch bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml keinen Abfall der Zellviabilität. Bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 0,1 mg/ml oder geringer, konnte nach 24-stündiger Inkubation kein toxischer Effekt bei den untersuchten Zelllinien beobachtet werden.

Die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay werden in der folgenden Tabelle 30 zusammengefasst.

*Tabelle 30: Ergebnisse der Zellviabilität gemessen mit dem CellTiter-Glo Assays nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid für die Zelllinien cerebEND, Caco-2, Hep G2, HEK-293 und H441. Die Zellviabilität wurde auf eine Kontrolle mit Basismedium normiert. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden mit \* gekennzeichnet. Die Pfeile sind wie folgt definiert: ↓ = Zellviabilität < 80%, → = Zellviabilität 80% – 120%, ↑ = Zellviabilität > 120%.*

CellTiter-Glo Assay	Zellviabilität nach Nanopartikel und Konzentration					
	Graphen [mg/ml]			Siliciumdioxid [mg/ml]		
	0,01	0,1	1	0,01	0,1	1
cerebEND	→	→	↓	→	→	↓*
Caco-2	→	→	→	↑	→	→
Hep G2	→	→	↓	→	→	↓
HEK-293	→	→	↓*	→	→	↓*
H441	→	→	↓*	→	→	↓*

Da nach 24-stündiger Inkubation in den Konzentrationen 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml keine toxische Wirkung von Siliciumdioxid und Graphen Nanopartikeln nachweisbar waren, könnte man in folgenden Versuchen die Inkubationszeit verlängern, um zu ermitteln, ob diese Konzentrationen nach längerer Inkubationszeit einen toxischen Effekt zeigen werden. Dies wäre vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen Akkumulation der Nanopartikel im Körper interessant. Ob und wie die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid im Körper akkumulieren und ob und wie sie wieder ausgeschieden werden müsste in einer weiteren Versuchsreihe untersucht werden. Bei einer Akkumulation der Nanopartikel im Körper könnte eine toxische Konzentration der Nanopartikel erreicht werden, die sich dann schädlich auf den Organismus auswirken würde.

Die Expression der Apoptose-Marker Bax und Caspase-3 wurde auf Gen-Ebene mittels PCR und auf Protein-Ebene mittels Western Blot bestimmt. Inwieweit die Nanopartikel bei der PCR und dem Western Blot mit der Messung interferiert haben, ist unklar. Zu beobachten war, dass beim Ernten der Proteine und der RNA immer auch Nanopartikel mit in die Proben gelangt sind. Zudem konnte bei den Proteinproben mit Graphen der Konzentration 1 mg/ml beim Ernten nach Zugabe von RIPA+ ein rötlich-pinker Farbum-



schlag beobachtet werden. Dieser Farbumschlag war auch noch in der Gelelektrophorese sichtbar, als rote Bande, die vor der eigentlichen blauen Lauffront der Proteinproben durch das Gel wanderte.

Wird eine Apoptose ausgelöst, so erfolgt als erstes eine Reaktion auf Gen-Ebene mit einem Anstieg der mRNA, welche für Bax und Caspase-3 codiert und in der PCR quantitativ bestimmt werden kann. Infolgedessen kommt es zu einer gesteigerten Produktion der Proteine Bax und Caspase-3. Die inaktive Caspase-3 wird im Laufe der Apoptose aktiviert und dabei in zwei kleinere Proteine gespalten, sodass es zu einem Abfall der inaktiven und einem Anstieg der aktiven Caspase-3 kommt. Die Proteinmengen wurden mittels Western Blot bestimmt.

Zunächst werden im Folgenden die Ergebnisse der PCR erläutert. Leider schlug die PCR bei der Zelllinie Hep G2 wiederholt fehl und konnte Mangels Zeit und Kapazität nicht nochmals wiederholt werden.

Für Graphen in allen verwendeten Konzentrationen zeigte die PCR bei den Zelllinien cerebEND, Caco-2 und H441 weder wesentliche Veränderungen der Bax- noch der Caspase-3-Genexpression. Bei der Zelllinie HEK-293 gab es für Graphen bei der Caspase-3-Genexpression ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Bax-Genexpression zeigte bei den HEK-293 Zelllinien, die mit Graphen inkubiert wurden, statistisch signifikante Abweichungen. Bei 0,01 mg/ml Graphen kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall, wohingegen es bei 0,1 mg/ml Graphen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Bax-Genexpression kam. Letzteres würde per se auf eine Apoptose hindeuten. Und schließlich zeigte sich bei 1 mg/ml Graphen keine wesentliche Abweichung der Bax-Genexpression von der Kontrolle. Nun würde man davon ausgehen, dass eine höhere Konzentration einer Substanz ebenfalls einen Anstieg der Bax-Genexpression verursachen und damit eine Apoptose auslösen würde, wenn dies bereits durch die geringere Konzentration bewirkt wird. Dies war hier allerdings nicht der Fall. Somit bleibt anzuzweifeln, ob diese beiden statistisch signifikanten Ergebnisse tatsächlich der Wirklichkeit entsprechen. Die Durchführung weiterer PCRs könnte darüber Aufschluss geben.

Bei den PCR Ergebnissen für Siliciumdioxid war auffällig, dass es bei den Zelllinien Caco-2 und HEK-293 sowohl bei der Bax- als auch der Caspase-3-Genexpression und bei der Zelllinie H441 bei der Bax-Genexpression bei den Proben mit 1 mg/ml Siliciumdioxid zu einem statistisch signifikanten Abfall kam. Wodurch dies verursacht wurde, bleibt unklar. Abgesehen davon kam es bei der Zelllinie cerebEND bei 0,1 mg/ml Siliciumdioxid zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Caspase-3-Genexpression. Alle

anderen PCR-Ergebnisse für Siliciumdioxid zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Der bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml aufgetretene statistisch signifikante Abfall der Bax-Genexpression kann auf ein sehr geringes Messergebnis in einer einzelnen PCR zurückgeführt werden. In dieser PCR kam für Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml der Signalanstieg für Bax verspätet nach allen anderen Proben und der Signalanstieg für CANX verfrüht vor den anderen Proben. Es handelt sich somit trotz des statistisch signifikanten Ergebnisses vermutlich um einen technischen Messfehler. Zudem kam es im Western Blot zu keinem Anstieg der Bax-Proteinexpression, was die Vermutung es handele sich um einen Messfehler stützt. Die Durchführung weiterer PCRs könnte darüber genaueren Aufschluss geben.

Die bei der Zelllinie cerebEND aufgetretene stark erhöhte, aber statistisch nicht signifikante Bax-Genexpression bei einer Siliciumdioxid Konzentration von 1 mg/ml ist auf das stark erhöhte Messergebnis einer einzelnen PCR zurückzuführen. Hierbei handelte es sich vermutlich ebenfalls um einen technischen Messfehler, da in dieser PCR für Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml der Signalanstieg für Bax vor allen anderen Proben und der Signalanstieg für CANX verspätet nach den anderen Proben auftrat. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass es beim Western Blot zu keinem Abfall der Bax-Proteinexpression bei 1 mg/ml Siliciumdioxid kam. Die Durchführung weiterer PCRs könnte auch hier genaueren Aufschluss geben.

Somit gab es in der PCR mit einer Ausnahme keine Erhöhung der Genexpression der Apoptose-Marker Bax und Caspase-3. Aus diesen Ergebnissen kann somit auch nicht auf eine Einleitung der Apoptose auf Genebene nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml geschlossen werden.

Die in der PCR beobachteten Schwankungen der Genexpression bei Graphen und Siliciumdioxid spiegelten sich größtenteils nicht in der Proteinexpression im Western Blot wider. Einzig bei der Zelllinie HEK-293 gab es für Bax gemeinsame statistisch signifikante Abfälle der Gen- und Protein-Expression. Die Ergebnisse des Western Blots werden im Folgenden erläutert.

Im Western Blot muss zwischen der inaktiven und der aktiven Caspase-3 unterschieden werden. Caspase-3 liegt zunächst als inaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa vor. Wird sie aktiviert, wird das Protein in zwei kleinere Proteine mit Molekulargewichten von 17 und 19 kDa gespalten. Im Western Blot lassen sich demnach bei eingetretener Apoptose zwei nah aneinander liegende Banden auf der PVDF-Membran

nachweisen, eine bei 17 und eine bei 19 kDa, sowie eine vermindert starke Bande bei 35 kDa. Tritt keine Apoptose ein, zeigt sich im Western Blot nur eine einzige Bande bei 35 kDa. Bei keinem der Versuche zeigte sich eine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa. Zudem gab es auch keine statistisch signifikanten Veränderungen der Proteinexpression der inaktiven Caspase-3. Daraus lässt sich schließen, dass es zu keiner Aktivierung der Caspase-3 und somit auch keiner Apoptose nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml gekommen ist.

Bei der Bax-Proteinexpression zeigten sich bei den Zelllinien cerebEND, Caco-2, Hep G2 und H441 keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. Einzig die Zelllinie HEK-293 zeigte bei 0,01 mg/ml Graphen sowie Siliciumdioxid der Konzentrationen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml eine statistisch signifikante Abnahme der Bax-Proteinexpression. Dieser Trend war für Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml und Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml bereits in der PCR zu erkennen. Da es allerdings zu keinem Anstieg der Bax-Proteinexpression gekommen ist, kann nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml keine Apoptose vermutet werden.

Somit kann aus den Ergebnissen des Western Blots ebenfalls nicht auf eine durch die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid verursachte Apoptose geschlossen werden. Dies war auch nicht zu erwarten gewesen, da bereits die PCR keine Hinweise auf eine Apoptose erbrachte und ein Anstieg der Genexpression einem Anstieg der Proteinexpression immer vorgeschaltet ist.

Da aufgrund der Ergebnisse der PCR und des Western Blot keine Hinweise auf eine Apoptose vorliegen, beruht die toxische Wirkung der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid, die bei einem Teil der Zelllinien ab einer Konzentration von 1 mg/ml nachgewiesen werden konnte, vermutlich auf Nekrose und nicht auf Apoptose.

In der Literatur findet man zur Toxizität der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid einige Untersuchungen, von denen einige im Folgenden exemplarisch aufgeführt werden.

In einer Arbeit wurde die Toxizität von Graphen und Kohlenstoff-Nanoröhrchen an PC12 Zellen (Ratten-Phäochromozytom-Zellen) untersucht. Dabei wurden die PC12 Zellen Graphen-Konzentrationen von bis zu 100 µg/ml ausgesetzt und anschließend wurde LDH, als Marker für Nekrose, und Caspase-3, als Marker für Apoptose, bestimmt. Es konnte eine signifikante LDH-Freisetzung als Zeichen einer Nekrose erst nach 24-stündiger Inkubation bei einer Graphen Konzentration von 100 µg/ml detektiert werden, nicht

bei niedrigeren Konzentrationen. Im Gegensatz dazu induzierten Kohlenstoff-Nanoröhrchen eine sehr starke LDH-Freisetzung, was eine Form-abhängige Toxizität nahelegt. In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass Graphen nach 24 Stunden Inkubation oxidativen Stress induzierte, zudem war auch eine Aktivierung von Caspase-3 nach 16 Stunden Inkubation Nachweisbar, was auf eine Apoptose hindeutet (Zhang et al., 2010). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit keine Caspae-3-Aktivierung nachgewiesen werden.

Im Maus-Modell konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass PEGylierte Graphen-Nanosheets sich nach intravenöser Applikation hauptsächlich im retikuloendothelialen System einschließlich Leber und Niere der Mäuse anreicherten. Die applizierte Dosis betrug 20 mg/kg. In dieser Studie konnten nach 3 Monaten keine toxischen Effekte nachgewiesen werden (Yang et al., 2011). Eine weitere Studie, die ebenfalls an Mäusen forschte, applizierte Graphen und Graphenoxid Nanopartikeln über oropharyngeale Aspiration. Die Ergebnisse legen nahe, dass durch die Nanopartikel Veränderungen der reaktiven Sauerstoffspezies induziert werden und die Sensitivität der peripheren Blutgefäße für Adrenorezeptor-vermittelte Vasokonstriktion erhöht wird, wodurch eine kardiovaskuläre Dysfunktion entstehen könnte (Krajnak et al., 2019).

Eine andere Arbeit beschäftigte sich mit der theoretischen Vorhersage der Deposition von Graphen-Nanoplättchen mit einem Durchmesser von 1 bis 30  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von 0,01 und 0,1  $\mu\text{m}$  im menschlichen Respirationstrakt bei hypothetischer Inhalation. Die Ergebnisse legen nahe, dass sich Graphen-Nanoplättchen mit einer Dicke von 0,01  $\mu\text{m}$  zu 20 bis 50% und mit einer Dicke von 0,1  $\mu\text{m}$  zu 20 bis 90% im Respirationstrakt ablagern. Bei Erhöhung der inhalativen Flussrate wurde theoretisch eine geringere Deposition von dünneren Graphen-Nanoplättchen berechnet. Des Weiteren wird angenommen, dass sich größere Graphen-Nanoplättchen vermehrt extrathorakal ablagern (Sturm, 2017).

Zur Untersuchung der toxischen Auswirkungen von Siliciumdioxid Nanopartikeln speziell auf die Lunge wurden in einer Studie in vitro an A549 Zellen (Lungenepithelzellen) geforscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Effekte der Nanopartikel entscheidend von den Inkubationsbedingungen, insbesondere der Zusammensetzung des Kulturmediums, abhängig sind. Verwendet wurden Siliciumdioxid Nanopartikel mit einer Größe von 22 nm. Unter typischen Kulturbedingungen mit Medium mit einem Serum-Anteil von 10% konnten bei Siliciumdioxid Nanopartikel in Konzentrationen von bis zu 1000  $\mu\text{g/ml}$  keine Effekte auf Form, Funktionalität oder Vitalität der Zellen beobachtet werden. In Serum-freiem Medium bewirkten Siliciumdioxid Konzentrationen ab 1  $\mu\text{g/ml}$  einen raschen und umfangreichen Zell-Schaden. Da die Zellen dabei zu schnell starben, um

Protein-Analysen durchführen zu können, wurde ein Serum-Anteil gesucht, bei dem toxische Effekte eintraten, die Zellen allerdings etwas länger überlebten. Dies konnte bei einem Serum-Anteil von 1,25% und einer Siliciumdioxid Nanopartikel Konzentration von 100 µg/ml erreicht werden. Dabei konnte ein Zelltod durch Apoptose nachgewiesen werden, sowie die Beeinflussung von weiteren biologischen Prozessen in den Zellen (Okoturo-Evans et al., 2013). In dieser Arbeit wurde nur Medium mit einem Serum-Anteil von 0% für die Inkubation mit den Nanopartikeln verwendet. Allerdings konnte dabei in dieser Arbeit kein solch gravierender Abfall der Zellviabilität nachgewiesen werden und auch keine Apoptose nachgewiesen werden. Dies lässt sich möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien zurückführen.

## **5 Zusammenfassung**

Die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid zeigen hohes Potential für das Drug Targeting, der zielgerichteten Anreicherung und Wirkung eines Medikaments an einem bestimmten Zielort unabhängig von dem Applikationsort. Doch zuvor muss geprüft werden, ob diese Nanopartikel eine toxische Wirkung besitzen. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Untersuchung der Toxizität der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid leisten.

Verwendet wurden Graphen Nanopartikel mit einer Dicke von 6 bis 8 nm und einer Breite von 15 µm und poröse kugelförmige Siliciumdioxid Nanopartikel mit einer Größe von 5 bis 20 nm. Die Nanopartikel wurden in Suspension mit Basismedium in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml für 24 Stunden im Zellmodell inkubiert. Verwendet wurden die Maus-Zelllinie cerebEND (zerebrale Endothelzellen) und die humanen Zelllinien Caco-2 (Kolonzellen), Hep G2 (Leberzellen), HEK-293 (Nierenzellen) und H441 (Lungenzellen).

Zur Untersuchung der Zellviabilität wurde der CellTiter-Glo Assay verwendet, ein auf Lumineszenzmessung basierender Test. Für Graphen Nanopartikel zeigte sich ab einer Konzentration von 1 mg/ml bei den Zelllinien HEK-293 und H441 ein statistisch signifikanter Abfall der Zellviabilität. CerebEND und Hep G2 Zellen reagierten auf Graphen Nanopartikel ab einer Konzentration von 1 mg/ml ebenfalls mit einem deutlichen Abfall der Zellviabilität, diese Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant. Die Zelllinie Caco-2 zeigte sich von den Graphen Nanopartikeln unbeeindruckt, es kam zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Zellviabilität. Siliciumdioxid Nanopartikel bewirkten ab einer Konzentration von 1 mg/ml einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität bei den Zelllinien cerebEND, HEK-293 und H441. HepG2 Zellen zeigten bei 1 mg/ml Siliciumdioxid einen deutlichen aber statistisch nicht signifikanten Abfall der Zellviabilität. Die Zelllinie Caco-2 erwies sich auch bei Siliciumdioxid Nanopartikel als äußerst robust und zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellviabilität.

Für Konzentrationen von 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml konnten weder bei Graphen noch bei Siliciumdioxid statistisch signifikante Abfälle der Zellviabilität nachgewiesen werden.

Messungen der Zellviabilität auf Grundlage von Adsorptionsmessung, wie beim EZ4U-Test, MTT-Test und LDH-Test, haben sich als ungeeignet erwiesen, da die Eigenfarbe der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid mit dieser Messung interferierte. MTT-Test und LDH-Test wurden bereits im Rahmen der Vorversuche wieder verlassen. Der EZ4U-Test wurde bei allen Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden ein paar Anpassungen des Tests unternommen, um den Einfluss der Nanopartikel auf die Messung so gering wie möglich zu halten. Obwohl die Ergebnisse des EZ4U-Tests teilweise vergleichbar mit denen des CellTiter-Glo Assays waren, kam es doch zu nicht unerheblichen Abweichungen, die vermutlich durch Interferenz der Nanopartikel entstanden. Die Ergebnisse des EZ4U-Tests wurden als nicht verlässlich bewertet und die des CellTiter-Glo Assay wurden ihnen vorgezogen.

Zudem wurde geprüft, ob die bei einem Teil der Zelllinien eingetretene toxische Wirkung der Nanopartikel ab einer Konzentration von 1 mg/ml durch Nekrose, dem unwillkürlichen Zelltod durch eine Läsion, oder durch Apoptose, dem programmierten Zelltod, zustande kam. Dafür wurde die Expression der Apoptose-Marker Bax und Caspase-3 auf Genebene mittels Polymerasekettenreaktion und auf Proteinebene mittels Western Blot bestimmt.

Die Polymerasekettenreaktion zeigte mit einer einzigen Ausnahme keine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression für Bax und Caspase-3 und gab somit auch keine Hinweise auf die Einleitung einer Apoptose. Einzig die Zelllinie HEK-293 zeigte in der Bax-Genexpression einen statistisch signifikanten Anstieg bei einer Graphen Konzentration von 0,1 mg/ml. Da es bei einer Graphen Konzentration von 1 mg/ml keine statistisch signifikante Veränderung gab, bleibt dieses Ergebnis anzuzweifeln. Für die Zelllinie Hep G2 liegen leider keine Ergebnisse zur Genexpression vor, da die Polymerasekettenreaktion mehrmals fehlgeschlagen ist und aus Zeit- und Kapazitätsgründen nicht nochmals wiederholt werden konnte.

Im Western Blot zeigte sich keine statistisch signifikante Erhöhung der Proteinexpression von Bax und Caspase-3. Dieses Ergebnis kann gut mit dem der Polymerasekettenreaktion in Einklang gebracht werden, da ohne einen Anstieg der Genexpression auch nicht mit einem Anstieg der Proteinexpression gerechnet werden kann. Zudem konnte im Western Blot auch keine aktivierte Caspase-3 nachgewiesen werden, die im Rahmen einer Apoptose durch die Spaltung der inaktiven Caspase-3 entstehen würde.

Somit liegen auf Grundlage von Polymerasekettenreaktion und Western Blot keine Hinweise auf das Eintreten einer Apoptose vor. Die toxische Wirkung der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid, die bei einem Teil der Zelllinien ab einer Konzentration von 1 mg/ml nachgewiesen werden konnte, beruht demnach vermutlich auf Nekrose.

Nach 24-stündiger Inkubation der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid in den Konzentrationen 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml war keine toxische Wirkung nachweisbar. Dies reicht allerdings noch nicht aus, den Nanopartikeln in dieser Konzentration eine Unbedenklichkeit in der Anwendung zuzuschreiben. Zu untersuchen bleibt, ob diese Konzentrationen nach längerer Inkubationszeit einen toxischen Effekt zeigen werden. Dies wäre vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen Akkumulation der Nanopartikel im menschlichen Körper interessant. Ob und wie die Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid im Körper akkumulieren und ob und wie sie wieder ausgeschieden werden muss weiter untersucht werden. Ebenfalls muss noch weiter untersucht werden, wie sich die Nanopartikel auf andere Zelltypen auswirken und welche Effekte sie im Tierversuch hervorrufen. Wie die Literatur zeigt, sind dabei Größe, Form und funktionelle Gruppen entscheidend für die toxischen Eigenschaften der Nanopartikel.

## 6 Literaturverzeichnis

- Arnemann, J. (2019). Mitose. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Vol. 3, pp. 1665-1666). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3532](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3532)
- ATCC. (o.J.-a). 293 [HEK-293] (ATCC® CRL-1573™). Retrieved 19.03.2021 from <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx>
- ATCC. (o.J.-b). Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™). Retrieved 19.03.2021 from <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx>
- ATCC. (o.J.-c). Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™). Retrieved 19.03.2021 from <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx>
- ATCC. (o.J.-d). NCI-H441 [H441] (ATCC® HTB-174™). Retrieved 19.03.2021 from <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-174.aspx>
- Böhmert, L., Laux, P., Luch, A., Braeuning, A., & Lampen, A. (2017). Nanomaterialien in Lebensmitteln – toxikologische Eigenschaften und Risikobewertung. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 60(7), 722-727. <https://doi.org/10.1007/s00103-017-2559-0>
- Boujard, D., Anselme, B., Cullin, C., Raguénès-Nicol, C., & Lechowski, S. (2014). Zellzyklus und Apoptose. In *Zell- und Molekularbiologie im Überblick* (Vol. 1, pp. 308-322). Springer Berlin Heidelberg.
- Burek, M., Salvador, E., & Förster, C. Y. (2012). Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. *J Vis Exp*(66), e4022. <https://doi.org/10.3791/4022>
- Chemie.de. (o.J.). *Mesoporöse Festkörper*. Retrieved 30.09.2021 from [https://www.chemie.de/lexikon/Mesopor%C3%B6se\\_Festk%C3%B6rper.html](https://www.chemie.de/lexikon/Mesopor%C3%B6se_Festk%C3%B6rper.html)
- Chen, M., Hu, J., Wang, L., Li, Y., Zhu, C., Chen, C., Shi, M., Ju, Z., Cao, X., & Zhang, Z. (2020). Targeted and redox-responsive drug delivery systems based on



carbonic anhydrase IX-decorated mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy. *Sci Rep*, 10(1), 14447. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71071-1>

DaNa. (o.J.-a). *Siliciumdioxid*. DaNa - Inforationen zur Sicherheit von neuen, innovativen Materialien und Nanomaterialien. Retrieved 30.09.2021 from <https://nanopartikel.info/wissen/materialien/siliziumdioxid/>

DaNa. (o.J.-b). *Was sind Nanopartikel?* DaNa - Inforationen zur Sicherheit von neuen, innovativen Materialien und Nanomaterialien. Retrieved 15.05.2021 from <https://nanopartikel.info/basics/faq/was-sind-nanopartikel/>

De Jong, W. H., & Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 3(2), 133-149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>

Dennyson Savariraj, A., Salih, A., Alam, F., Elsherif, M., AlQattan, B., Khan, A. A., Yetisen, A. K., & Butt, H. (2021). Ophthalmic Sensors and Drug Delivery. *ACS Sensors*, 6(6), 2046-2076. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00370>

Depan, D., Shah, J., & Misra, R. D. K. (2011). Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response. *Materials Science and Engineering: C*, 31(7), 1305-1312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.010>

El-Maraghy, C. M., El-Borady, O. M., & El-Naem, O. A. (2020). Effective Removal of Levofloxacin from Pharmaceutical Wastewater Using Synthesized Zinc Oxid, Graphen Oxid Nanoparticles Compared with their Combination. *Sci Rep*, 10(1), 5914. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61742-4>

Gazsó, A., & Haslinger, J. (2014). Nano Risiko Governance - Der gesellschaftliche Umgang mit Nanotechnologien. In (Vol. 1, pp. 3-28). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1405-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1405-6_6)

Geim, A., & Novoselov, K. (2010). *The Nobel Prize in Physics 2010 - Graphene - the perfect atomic lattice*. Retrieved 14.05.2021 from <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/2010/illustrated-information/>

Herold, G., & Mitarbeiter. (2020). Silikose. In *Innere Medizin* (pp. 394-395).

- Horn, F. (2012). Zellzyklus und Apoptose. In *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium* (Vol. 5, pp. 252-267). Thieme Stuttgart.
- Hoseini-Ghahfarokhi, M., Mirkiani, S., Mozaffari, N., Abdolahi Sadatlu, M. A., Ghasemi, A., Abbaspour, S., Akbarian, M., Farjadain, F., & Karimi, M. (2020). Applications of Graphene and Graphene Oxide in Smart Drug/Gene Delivery: Is the World Still Flat? *Int J Nanomedicine*, 15, 9469-9496. <https://doi.org/10.2147/ijn.S265876>
- Huang, J.-F., Zhong, J., Chen, G.-P., Lin, Z.-T., Deng, Y., Liu, Y.-L., Cao, P.-Y., Wang, B., Wei, Y., Wu, T., Yuan, J., & Jiang, G.-B. (2016). A Hydrogel-Based Hybrid Theranostic Contact Lens for Fungal Keratitis. *ACS Nano*, 10(7), 6464-6473. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00601>
- Kim, J., Kim, M., Lee, M.-S., Kim, K., Ji, S., Kim, Y.-T., Park, J., Na, K., Bae, K.-H., Kyun Kim, H., Bien, F., Young Lee, C., & Park, J.-U. (2017). Wearable smart sensor systems integrated on soft contact lenses for wireless ocular diagnostics. *Nature Communications*, 8(1), 14997. <https://doi.org/10.1038/ncomms14997>
- Krajnak, K., Waugh, S., Stefaniak, A., Schwegler-Berry, D., Roach, K., Barger, M., & Roberts, J. (2019). Exposure to graphene nanoparticles induces changes in measures of vascular/renal function in a load and form-dependent manner in mice. *J Toxicol Environ Health A*, 82(12), 711-726. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1645772>
- Krug, H. F., & Hartmann-Schreier, J. (2016). *Siliciumdioxid* RÖMPP. <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-19-02447>
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 5-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg293>
- Liu, Q., Santamaria, C. M., Wei, T., Zhao, C., Ji, T., Yang, T., Shomorony, A., Wang, B. Y., & Kohane, D. S. (2018). Hollow Silica Nanoparticles Penetrate the Peripheral Nerve and Enhance the Nerve Blockade from Tetrodotoxin. *Nano Letters*, 18(1), 32-37. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b02461>
- Müller-Esterl, W., Brandt, U., Anderka, O., Kerscher, S., Kieß, S., & Ridinger, K. (2018a). Vier Elemente dominieren die belebte Natur. In *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* (Vol. 3, pp. 3-5). Springer Berlin Heidelberg.

- Müller-Esterl, W., Brandt, U., Anderka, O., Kerscher, S., Kieß, S., & Ridinger, K. (2018b). Zellzyklus und programmierter Zelltod. In *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* (Vol. 3, pp. 516-526). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54851-6\\_34](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54851-6_34)
- Novoselov, K. S., Fal'ko, V. I., Colombo, L., Gellert, P. R., Schwab, M. G., & Kim, K. (2012). A roadmap for graphene. *Nature*, *490*(7419), 192-200. <https://doi.org/10.1038/nature11458>
- Okoturo-Evans, O., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., Cupitt, J., Gierula, M., Boobis, A. R., & Edwards, R. J. (2013). Elucidation of toxicity pathways in lung epithelial cells induced by silicon dioxide nanoparticles. *PloS one*, *8*(9), e72363.
- RÖMpp-Redaktion, & Balgar, T. (2010). *Graphen* RÖMPP. <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-07-02758>
- She, X., Chen, L., Yi, Z., Li, C., He, C., Feng, C., Wang, T., Shigdar, S., Duan, W., & Kong, L. (2018). Tailored Mesoporous Silica Nanoparticles for Controlled Drug Delivery: Platform Fabrication, Targeted Delivery, and Computational Design and Analysis. *Mini Rev Med Chem*, *18*(11), 976-989. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160505114814>
- Sitzmann, H., Redaktion, R., & Hartwig, A. (2020). *Silicium* RÖMPP. <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-19-02444>
- Sturm, R. (2017). Inhalation of nanoplatelets - Theoretical deposition simulations. *Z Med Phys*, *27*(4), 274-284. <https://doi.org/10.1016/j.zemedi.2017.06.001>
- Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *11*, S81-S91. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00166-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00166-4)
- Wang, Z., Colombi Ciacchi, L., & Wei, G. (2017). Recent Advances in the Synthesis of Graphene-Based Nanomaterials for Controlled Drug Delivery. *Applied Sciences*, *7*(11), 1175. <https://www.mdpi.com/2076-3417/7/11/1175>
- Xie, J., Xiao, D., Zhao, J., Hu, N., Bao, Q., Jiang, L., & Yu, L. (2016). Mesoporous Silica Particles as a Multifunctional Delivery System for Pain Relief in Experimental

Neuropathy. *Advanced Healthcare Materials*, 5(10), 1213-1221.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.201500996>

Yang, K., Wan, J., Zhang, S., Zhang, Y., Lee, S.-T., & Liu, Z. (2011). In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano*, 5(1), 516-522. <https://doi.org/10.1021/nn1024303>

Zhang, W., Liu, M., Liu, A., & Zhai, G. (2017). Advances in Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Tumor Targeted Drug Delivery and Theranostics. *Curr Pharm Des*, 23(23), 3367-3382.  
<https://doi.org/10.2174/1381612822666161025153619>

Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D., & Biris, A. S. (2010). Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano*, 4(6), 3181-3186.  
<https://doi.org/10.1021/nn1007176>

## I. Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{l}$	Mikroliter
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium-Ion
CANX	Calnexin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
G	Graphen
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GO	Graphenoxid
h	Stunde
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoffsäure)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Mitose
MDB	Membrane Desalting Buffer
mg	Milligramm
$\text{Mg}^{2+}$	Magnesium-Ion
min	Minute

ml	Milliliter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MTT	Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NP-40	Nonoxinol 40
O	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	p-Coumaric-Acid
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PS	Penicillin/Streptomycin
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RIPA+	RIPA mit Zusatz von Protease-Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
S	Siliciumdioxid
S	Synthese
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodiumdodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis)
sec	Sekunde
Si	Silicium
SiO <sub>2</sub>	Siliciumdioxid
β-ME	β-Mercaptoethanol
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

## II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: EZ4U Test der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen  $c_3$  und  $\text{SiO}_2$   $c_3$  zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität. .... 44
- Abbildung 2: EZ4U Test der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen  $c_3$  zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. Dahingegen zeigten  $\text{SiO}_2$   $c_1$  und  $c_2$  einen statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität. .... 45
- Abbildung 3: EZ4U Test der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen  $c_3$  zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. .... 46
- Abbildung 4: EZ4U Test der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen  $c_3$  zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. .... 47
- Abbildung 5: EZ4U Test der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen  $c_2$  und  $c_3$ , sowie  $\text{SiO}_2$   $c_3$  zeigten einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. .... 48
- Abbildung 6: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium.  $\text{SiO}_2$   $c_3$  zeigte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität. .... 49
- Abbildung 7: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 50
- Abbildung 8: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$

mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 51

Abbildung 9: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 und SiO<sub>2</sub> c3 zeigten einen signifikanten Abfall der Zellviabilität. .... 52

Abbildung 10: CellTiter-Glo Assay der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Graphen c3 und SiO<sub>2</sub> c3 zeigten einen signifikanten Abfall der Zellviabilität. .... 53

Abbildung 11: Bax-Genexpression der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 55

Abbildung 12: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Bande zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression..... 56

Abbildung 13: Bax-Genexpression der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression. .... 57

Abbildung 14: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression..... 58

Abbildung 15: Bax-Genexpression der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierten Blaken zeigten eine statistisch signifikante Minderung bzw. Erhöhung der Genexpression..... 59



Abbildung 16: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Proteinexpression. .... 60

Abbildung 17: Bax-Genexpression der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierte Blake zeigte eine statistisch signifikante Minderung der Genexpression. .... 61

Abbildung 18: Caspase-3-Genexpression der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 62

Abbildung 19: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie cerebEND mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 ( Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar. .... 63

Abbildung 20: Bax-Proteinexpression der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 64

Abbildung 21: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie cerebEND nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 65

Abbildung 22: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie Caco-2 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2

(Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar..... 65

Abbildung 23: Bax-Proteinexpression der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 66

Abbildung 24: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie Caco-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 67

Abbildung 25: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie Hep G2 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar..... 67

Abbildung 26: Bax-Proteinexpression der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 68

Abbildung 27: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie Hep G2 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) in den Konzentrationen c1 = 0,01 mg/ml, c2 = 0,1 mg/ml und c3 = 1 mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 69

Abbildung 28: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie HEK-293 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1

mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar..... 70

Abbildung 29: Bax-Proteinexpression der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Die mit \* markierten Blaken zeigten eine statistisch signifikante Minderung der Proteinexpression. .... 71

Abbildung 30: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie HEK-293 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 72

Abbildung 31: Bandenmuster eines Western Blots der Zelllinie H441 mit den Proteinen  $\beta$ -Aktin, Caspase-3 und Bax nach 24-stündiger Inkubation mit G1 (Graphen der Konzentration 0,01 mg/ml), G2 (Graphen der Konzentration 0,1 mg/ml), G3 (Graphen der Konzentration 1 mg/ml), S1 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,01 mg/ml), S2 (Siliciumdioxid der Konzentration 0,1 mg/ml), S3 (Siliciumdioxid der Konzentration 1 mg/ml) und den beiden Kontrollen K1 und K2 (Basismedium). Es war keine Caspase-3 Bande bei 17 und 19 kDa nachweisbar..... 72

Abbildung 32: Bax-Proteinexpression der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 73

Abbildung 33: Caspase-3-Proteinexpression (inaktive Caspase-3) der Zelllinie H441 nach 24-stündiger Inkubation mit Graphen und Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in den Konzentrationen  $c_1 = 0,01$  mg/ml,  $c_2 = 0,1$  mg/ml und  $c_3 = 1$  mg/ml normiert auf eine Kontrolle mit Basismedium. Es gab keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Kontrolle. .... 74

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	13
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	14
Tabelle 3: Medien, Zusätze und Substanzen für die Zellkultur .....	16
Tabelle 4: Kits.....	16
Tabelle 5: RT-qPCR Sonden .....	17
Tabelle 6: Western Blot Antikörper.....	17
Tabelle 7: Sonstige Substanzen .....	17
Tabelle 8: Zelllinien im Überblick .....	19
Tabelle 9: Kultivierung der Zellen.....	21
Tabelle 10: Konzentrationen der Nanopartikel .....	22
Tabelle 11: Inkubation der 96-Well-Platte .....	24
Tabelle 12: Inkubation der 6-Well-Platten .....	28
Tabelle 13: Mastermix zur cDNA-Herstellung mit Endvolumen von 6,8 µ für eine RNA-Probe.....	30
Tabelle 14: Zusammensetzung RIPA-Puffer .....	31
Tabelle 15: BSA-Verdünnungsreihe.....	32
Tabelle 16: Zusammensetzung Lämmli 4x.....	33
Tabelle 17: Zusammensetzung Trenngel (15%).....	34
Tabelle 18: Zusammensetzung Sammelgel .....	34
Tabelle 19: Zusammensetzung Elektrophorese-Puffer.....	35
Tabelle 20: Zusammensetzung Towbin-Puffer .....	36
Tabelle 21: Zusammensetzung 5% Milch in PBS.....	36
Tabelle 22: Western Blot Antikörper.....	36
Tabelle 23: Zusammensetzung 0,1% TWEEN in PBS .....	38
Tabelle 24: Zusammensetzung 5% BSA in 0,1% TWEEN in PBS.....	38
Tabelle 25: Zusammensetzung 5% Milch in 0,1% TWEEN in PBS .....	38
Tabelle 26: Zusammensetzung 1% BSA in PBS .....	38
Tabelle 27: Zusammensetzung 50 ml ECL I .....	39
Tabelle 28: Zusammensetzung 50 ml ECL II .....	39
Tabelle 29: Übersicht Inkubation der Membran für den Western Blot.....	40
Tabelle 30: Ergebnisse der Zellviabilität gemessen mit dem CellTiter-Glo Assays nach 24-stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln Graphen und Siliciumdioxid für die Zelllinien cerebEND, Caco-2, Hep G2, HEK-293 und H441. Die Zellviabilität wurde auf eine Kontrolle mit Basismedium normiert. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden mit * gekennzeichnet. Die Pfeile sind wie folgt definiert: ↓ = Zellviabilität < 80%, → = Zellviabilität 80% – 120%, ↑ = Zellviabilität > 120%.....	80

#### **IV. Danksagung**

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jens Broscheit für die Unterstützung und bei meinem Betreuer M.D. Ph.D. Sergey Shityakov für die Bereitstellung des Themas.

Bei PD Dr. rer. nat. Malgorzata Burek bedanke ich mich ganz herzlich für die vielen Ratschläge.

Großer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Elisabeth Wilken und Anja Neuhoff, die mich in die Laborarbeit eingeführt und immer mit Rat und Tat unterstützt haben. Und ich bedanke mich bei Katharina Pech, auf die ich mich bei Bestellungen fürs Labor immer verlassen konnte.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Doktoranden-Kollegen für die gegenseitige Unterstützung und Motivation.

Und zu guter Letzt geht mein Dank auch an meine Familie und Freunde für den Rückhalt und die Unterstützung.

## **V. Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme**

Veröffentlichter Abstract:

Gegg T, Burek M, Roewer N, Shityakov S, Broscheit J (2020): Toxizität der Nanopartikel Graphen und Siliciumdioxid im Zellmodell. In: Anästhesiologie & Intensivmedizin 61. Jahrgang, Supplement Nr. 11/2020, S. 201. Online verfügbar unter [https://www.ai-online.info/images/ai-ausgabe/2020/05-2020/Supplement\\_11-2020\\_DAC\\_Abstracts\\_1.pdf](https://www.ai-online.info/images/ai-ausgabe/2020/05-2020/Supplement_11-2020_DAC_Abstracts_1.pdf)