Influence of nanomaterials on cell function

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart Zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

FURONG TIAN

aus China

Hauptberichter: Prof. Dr. E. Arzt Mitberichter: Prof. Dr. J. Spatz Tag der Einreichung: 10. November 2005 Tag der Prüfung: 12. Januar 2006

 $Max-PLanck-Institut \ F\" ur \ Metallforschung \ Stuttgart$

2006

Contents

	List of abbreviations Summary	13 15
Chapter 1 1.1 1.2 1.2.1 1.2.2 1.3	General introduction Nanoscale materials Carbon nanotubes Carbon nanotube application in biology Influence of carbon nanotube on cells and tissues Nanostructures Nanostructures in biology	17 17 18 19 20 20
Chapter 2 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.2 2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.3 2.4	Effects of single wall carbon nanotubes on PCR Introduction Parameters influencing the yield and specificity of PCR Purification of SWCNTs XPS - X-ray photoelectron spectroscopy Materials and methods XPS analysis PCR preparation Pt-labeled DNA fragment preparation and observation Results and discussion Conclusion	21 22 24 25 26 26 27 27 30 32
Chapter 3	Cytotoxicity of single wall carbon nanotube on human	33
3.1 3.1.1	Introduction Influence of carbon nanotubes and associated nanomaterials on human cells and environment	34 34
3.1.2 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7 3.2.8 3.2.9 3.3 3.3.1	Extracellular signals Materials and methods Types of particle Cell culture Cell survival assay Specimen preparation for TEM and observation Scanning electron microscopy Immunocytochemical analysis Western blot analysis Cell death assay Statistical analysis Results Influences of the different materials on cell survival	36 37 37 38 39 39 40 40 40 40 41 42 42

3.3.2	Cell death assays	42
3.3.3	Effect of SWCNT on cell morphology	44
3.3.4.1	Immunostaining assays	46
3.3.4.2	Western blot assays	47
3.4	Discussion	49
Chapter 4	Effect of single wall carbon nanotube on human	52
-	HEK293 cells	
4.1	Introduction	53
4.1.1	Apoptosis and cell cycle progression	53
4.2	Materials and methods	54
4.2.1	Antibodies	55
4.2.2	Cell viability and proliferation assay	55
4.2.3	Detection of adhesion ability	55
4.2.4	Observation under scanning electron microscopy	55
4.2.5	DNA fragmentation	55
4.2.6	Flow cytometry analysis	55
4.2.7	SDS-PAGE analysis and western blot analysis	56
4.2.8	Immunofluorescent staining analysis	56
4.2.9	Microarray analysis	56
4.2.9.1	Fabrication of microarrays	56
4.2.9.2	Hybridization and washing	57
4.2.9.3	Detection and analysis	57
4.2.10	Data analysis	57
4.3	Results	58
4.3.1	Effect of SWCNTs on the viability and proliferation of HEK293 cells	59
4.3.2	Effect of SWCNTs on cell adhesion	60
4.3.3	Induction of apoptosis of HEK293 cells by SWCNTs	61
4.3.4	Effect of SWCNTs on adhesive proteins and cyclin D3 in HEK293 cells	58
4.3.5	Active responses of HEK293 cells to SWCNTs	64
4.3.6	Gene expression profile between HEK293 cells	65
	with or without SWCNTs by oligonucleotide	
	microarrays	
4.4	Discussion	67
Chapter 5	Binding RGD to a nanostructured hydrogel	70
5.1	Introduction	70
5.1.1	Polymers	70
5.1.2	Cell adhesion and the extracellular matrix	72
5.1.3	RGD Peptides on the surface	72
5.1.4	Immobilization of RGD and proteins on the surface	73

nanostructured hydrogel5.2.1Gold dot nanostructures775.2.1.1Diblock copolymer micelles775.2.1.2Calculation of the quantity of gold acid775.2.1.3Formation of thin polymer films775.2.1.4Tessellations in micelles order785.2.1.5Reduction and deposition of metal clusters795.2.1Preparation of polymers805.3Analytics825.3.1Detection of nanopatterned surfaces825.3.2Cryo SEM observation of nanostructured surfaces835.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2Polymer preparation845.4.2.3PEG (Mw=700kDa)845.4.2.3PEG (Mw=70kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.2	Proceduce of immobilization RGD on	75
5.2.1 Gold dot nanostructures 77 5.2.1.1 Diblock copolymer micelles 77 5.2.1.2 Calculation of the quantity of gold acid 77 5.2.1.3 Formation of thin polymer films 77 5.2.1.4 Tessellations in micelles order 78 5.2.1.5 Reduction and deposition of metal clusters 79 5.2.2 Preparation of polymers 80 5.3 Analytics 82 5.3.1 Detection of nanopatterned surfaces 82 5.3.2 Cryo SEM observation of nanostructured surfaces 83 5.4.4 Materials and methods 83 5.4.1 Nanopatterned glass substrate preparation 83 5.4.2 PEG (Mw=700kDa) 84 5.4.2.3 PEG (Mw=700kDa) 85 5.4.2.3 PEG (Mw=575kDa) 86 5.5.1 Nanosturctures on glass surface 88 5.5.2 Micro and nanostructures on hydrogel 88 5.6 Conclusion 90 Chaper 6 Cell adhesion on Nanostructured hydrogel 91 6.1 Introduction 92		nanostructured hydrogel	
5.2.1.1 Diblock copolymer micelles 77 5.2.1.2 Calculation of the quantity of gold acid 77 5.2.1.3 Formation of thin polymer films 77 5.2.1.4 Tessellations in micelles order 78 5.2.1.5 Reduction and deposition of metal clusters 79 5.2.1 Preparation of polymers 80 5.3 Analytics 82 5.3.1 Detection of nanopatterned surfaces 82 5.3.2 Cryo SEM observation of nanostructured surfaces 83 5.4 Materials and methods 83 5.4.1 Nanopatterned glass substrate preparation 83 5.4.2 Polymer preparation 84 5.4.2.1 PEG (Mw=300kDa) 84 5.4.2.3 PEG (Mw=575kDa) 86 5.4.3 Sterilization of hydrogels 87 5.5 Results and discussion 87 5.5.1 Nanosturctures on glass surface 88 5.5.2 Micro and nanostructured hydrogel 91 6.1 Introduction 92 6.2 Materials and methods 93	5.2.1	Gold dot nanostructures	77
5.2.1.2 Calculation of the quantity of gold acid 77 5.2.1.3 Formation of thin polymer films 77 5.2.1.4 Tessellations in micelles order 78 5.2.1.5 Reduction and deposition of metal clusters 79 5.2.2 Preparation of polymers 80 5.3 Analytics 82 5.3.1 Detection of nanopatterned surfaces 83 5.4 Materials and methods 83 5.4.1 Nanopatterned glass substrate preparation 83 5.4.2 Polymer preparation 83 5.4.2 Polymer preparation 83 5.4.2 Polymer preparation 83 5.4.2 Polymer probability 84 5.4.2.1 PEG (Mw=700kDa) 84 5.4.2.2 PEG (Mw=705kDa) 86 5.4.3 Sterilization of hydrogels 87 5.5 Results and discussion 87 5.5.1 Nanosturctures on glass surface 88 5.5.2 Micro and nanostructured hydrogel 91 6.1 Introduction 92 6.2 Materials	5.2.1.1	Diblock copolymer micelles	77
5.2.1.3 Formation of thin polymer films 77 5.2.1.4 Tessellations in micelles order 78 5.2.1.5 Reduction and deposition of metal clusters 79 5.2.2 Preparation of polymers 80 5.3 Analytics 82 5.3.1 Detection of nanopatterned surfaces 82 5.3.2 Cryo SEM observation of nanostructured surfaces 83 5.4 Materials and methods 83 5.4.1 Nanopatterned glass substrate preparation 83 5.4.2 PeG (Mw=700kDa) 84 5.4.2.3 PEG (Mw=700kDa) 85 5.4.2.3 PEG (Mw=75kDa) 86 5.5.7 Results and discussion 87 5.5.8 Results and discussion 87 5.5.1 Nanosturctures on glass surface 88 5.6 Conclusion 90 Chaper 6 Cell adhesion on Nanostructured hydrogel 91 6.1 Introduction 92 6.2 Materials and methods 93 6.2.1 General methods for cell culture 94 6.2.2 <	5.2.1.2	Calculation of the quantity of gold acid	77
5.2.1.4Tessellations in micelles order785.2.1.5Reduction and deposition of metal clusters795.2.2Preparation of polymers805.3Analytics825.3.1Detection of nanopatterned surfaces825.3.2Cryo SEM observation of nanostructured surfaces835.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.3PEG (Mw=700kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanostructures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.1Cell spreading on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots976.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.2.1.3	Formation of thin polymer films	77
5.2.1.5Reduction and deposition of metal clusters795.2.2Preparation of polymers805.3Analytics825.3.1Detection of nanopatterned surfaces825.3.2Cryo SEM observation of nanostructured surfaces835.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.3.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructured nydrogel916.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.3Results966.3.4Cell spreading on PEG gel966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots977Zusammenfassung101Appendix108	5.2.1.4	Tessellations in micelles order	78
5.2.2Preparation of polymers805.3Analytics825.3.1Detection of nanopatterned surfaces825.3.2Cryo SEM observation of nanostructured surfaces835.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.3Sterilization of hydrogels875.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructured nydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel916.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.2.1.5	Reduction and deposition of metal clusters	79
5.3Analytics825.3.1Detection of nanopatterned surfaces825.3.2Cryo SEM observation of nanostructured surfaces835.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.2.3PEG (Mw=575kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel916.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots966.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.2.2	Preparation of polymers	80
5.3.1Detection of nanopatterned surfaces825.3.2Cryo SEM observation of nanostructured surfaces835.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=70kDa)855.4.2.3PEG (Mw=75kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.3	Analytics	82
5.3.2Cryo SEM observation of nanostructured surfaces835.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2PEG (Mw=800kDa)845.4.2.1PEG (Mw=700kDa)855.4.2.2PEG (Mw=700kDa)865.4.2.3PEG (Mw=575kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.3.1	Detection of nanopatterned surfaces	82
5.4Materials and methods835.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.2.3PEG (Mw=75kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.3.2	Cryo SEM observation of nanostructured surfaces	83
5.4.1Nanopatterned glass substrate preparation835.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.2.3PEG (Mw=575kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel966.3.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.4	Materials and methods	83
5.4.2Polymer preparation835.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.2.3PEG (Mw=575kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel966.3.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.4.1	Nanopatterned glass substrate preparation	83
5.4.2.1PEG (Mw=800kDa)845.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.2.3PEG (Mw=575kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.4.2	Polymer preparation	83
5.4.2.2PEG (Mw=700kDa)855.4.2.3PEG (Mw=575kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.4.2.1	PEG (Mw=800kDa)	84
5.4.2.3PEG (Mw=575kDa)865.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel91916.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.3.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Cusammenfassung101101Appendix108	5.4.2.2	PEG (Mw=700kDa)	85
5.4.3Sterilization of hydrogels875.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	5.4.2.3	PEG $(Mw=575kDa)$	86
5.5Results and discussion875.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction6.2Materials and methods6.2.1General methods for cell culture6.2.2Cell counting6.3Results6.3Results6.3.1Cell spreading on PEG gel6.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots6.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.4.3	Sterilization of hydrogels	87
5.5.1Nanosturctures on glass surface885.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel6.1Introduction6.2Materials and methods6.2.1General methods for cell culture6.2.2Cell counting6.3.3Results6.3.1Cell spreading on PEG gel6.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots6.4Discussion7Zusammenfassung101Appendix108	5.5	Results and discussion	87
5.5.2Micro and nanostructures on hydrogel885.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel916.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots976.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.5.1	Nanosturctures on glass surface	88
5.6Conclusion90Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel916.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots976.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.5.2	Micro and nanostructures on hydrogel	88
Chaper 6Cell adhesion on Nanostructured hydrogel916.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots976.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	5.6	Conclusion	90
6.1Introduction926.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots97Zusammenfassung101Appendix108	Chaper 6	Cell adhesion on Nanostructured hydrogel	91
6.2Materials and methods936.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots976.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	6.1	Introduction	92
6.2.1General methods for cell culture946.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots976.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	6.2	Materials and methods	93
6.2.2Cell counting946.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots976.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	6.2.1	General methods for cell culture	94
6.2.3Observation under phase contrast microscopy966.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots966.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	6.2.2	Cell counting	94
6.3Results966.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots966.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	6.2.3	Observation under phase contrast microscopy	96
6.3.1Cell spreading on PEG gel966.3.2Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots966.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	6.3	Results	96
 6.3.2 Cell adhesion on PEG gel modulated by the distance between RGD-nanodots 6.4 Discussion 97 Zusammenfassung 101 Appendix 108 	6.3.1	Cell spreading on PEG gel	96
6.4distance between RGD-nanodots Discussion97Zusammenfassung101Appendix108	6.3.2	Cell adhesion on PEG gel modulated by the	96
6.4Discussion97Zusammenfassung101Appendix108		distance between RGD-nanodots	
Zusammenfassung 101 Appendix 108	6.4	Discussion	97
Appendix 108		Zusammenfassung	101
		Appendix	108
Acknowledgements 132		Acknowledgements	132
Curriculum vitae 134		Curriculum vitae	134
Reference 135		Reference	135

Summary

The intention of this work was to study the mechanisms of the interactions between nanomaterials and cells. The experiments carried out during this thesis focused on two kinds of nanomaterials: single wall carbon nanotube (SWCNT) and nanostructured hydrogels. The biological applications of novel nanomaterials that have emerged in this field during the past decade are illustrated with the help of selected examples and discussed. Different approaches for the description of the interactions of nanomaterials and cells are described in chapters 2 to 6. The influences of SWCNT are shown in chapters 2 to 4. Nanostructured hydrogels were created with the use of lithographic techniques. The application of these hydrogels is described in chapters 5 and 6.

Chapter 1 provides a general introduction to the field of nanomaterials such as SWCNT and nanostructured hydrogels.

In chapter 2, the effects of SWCNT on the polymerase chain reaction (PCR) are investigated via quantitative PCR product measurements using scanning electron microscopy (SEM), high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The measurements show that adding SWCNTs to the reaction liquid increase the amount of PCR product at SWCNT concentrations below 3 $\mu g/\mu$ l, but have a reversed effect at higher SWCNT concentrations. Similar results were obtained in PCR reactions with or without Mg²⁺ additive. Both SEM and HRTEM measurements show that the DNA templates and Taq enzymes are attached to bundles of SWCNTs in PCR products. XPS spectra show that the C 1s binding energy in PCR products increased after the reaction because of the emergence of two new peaks beside the main peak, if compared with carbon nanotubes before the reaction. This suggests a chemical reaction between the SWCNT and the PCR components. SWCNT may increase the PCR efficiency at a concentration range of less than 3 $\mu g/\mu l$ in the reaction liquid and have the potential to act as catalysts in a variety of biochemical reactions.

Chapter 3 shows a systematic study on human fibroblasts in the presence of refined CNTs with different geometries and sizes. The results were compared to other carbon materials. Particularly the cell survival has been studied with five kinds of carbon materials. In increasing order these are: i) SWCNT, ii) active carbon, iii) carbon black, iv) multiwall carbon nanotubes, and finally, v) carbon graphite. Interestingly, we found a strong size, time, and dose effect of carbon materials upon the cell survival. Furthermore, we observed that lower concentrations of SWCNTs than those reported in the literature induce cell death. Since

SUMMARY

carbon materials disturb cell membranes, thereby inducing cells to detach from substrates, we measured the expression of cell adhesion related proteins, such as Laminin, Collagen-IV, Fibronectin, P-Cadherin and focal adhesion kinase. Finally, a biological mechanism that explains why smaller particles (e.g. SWCNT) have more influence is presented.

In chapter 4, the influence of SWCNT on human HEK293 cells is investigated with the aim of exploring SWCNTs biocompatibility. Results of dose and time dependent experiments show that SWCNTs can inhibit HEK293 cell proliferation and decrease the cell adhesive abilities. HEK293 cells exhibit active responses to SWCNT such as secretion of several 20–30 kD proteins to wrap SWCNTs, aggregation of cells attached by SWCNTs and formation of nodular structures. Cell cycle analysis showed that 25 μ g/ml SWCNTs induced G1 arrest and cell apoptosis in HEK293 cells. Biochip analysis showed that SWCNTs can induce upregulation expression of cell cycle genes such as *p16, bax, p57, hrk, cdc42* and *cdc37*, down-regulation expression of signal transduction associated genes such as *mad2, jak1, ttk, pcdha9* and *erk*. Western blot analysis showed that SWCNTs can induce down-regulation expression of adhesion-associated proteins such as laminin, fibronectin, cadherin, FAK and collagen IV. In conclusion, SWCNTs can inhibit HEK293 cell growth by inducing cell apoptosis and decreasing cellular adhesion abilities.

In chapter 5 a new lithographic method is developed, employing a thiol linker to transfer nanostructures to soft materials. The particles form extended hexagonal patterns of Aunanoparticles on hydrogel showing the same arrangement as nanopatterns on the glass slide. Further improvement in the preparation of hydrogel allows the transfer of nanostructures without losing the hexagonal order. The structure and density of nanostructured hydrogels is controlled by Au nanoparticle patterning on solid substrates. This method provides a nanomask to control the position and connect the molecule (e.g. RGD) to the polymer surfaces. The nanostructured hydrogel is employed as cell adhesive templates, demonstrating the successful application of micellar nano- and soft lithography techniques to various research fields. For example, this method provides a way for study of interaction between cells and substrate deformation.

In chapter 6, the cell adhesion has been investigated on the nanostructured hydrogel, which can be controlled by diblock polymer micelle and polymer swelling. This approach has revealed that the distance between RGD strongly controls cell adhesion and that large distances between RGD hamper cell adhesion. Previous studies showed that cell attachment, growth and differentiation depends on the distance between gold nanodots. The same relationship between cell behaviour and dots distance was observed when cells were plated and grown on a soft nanostructured surfaces.

Zusammenfassung

Die biologischen Anwendungen von neuen Nanomaterialien hat großes Interesse erzeugt. Kohlenstoffnanoröhrchen (CNT) wurden in den letzten Jahren auf Grund ihrer einzigartigen Eigenschaften in Bezug auf molekulare Elektronik und Biosensoren intensiv untersucht. Nanostrukturen werden in verschiedenen Gebieten wie der Physik, der physikalischen Chemie, der Materialwissenschaften sowie der Chemo- und der Elektrotechnik benutzt. Nanostrukturierte Oberflächen können verwendet werden, um eine kleine Zahl chemischer Einheiten zu verwalten/kontrollieren und Zelladhäsion auf molekularer Ebene zu untersuchen. Das Ziel dieser Arbeit war es die Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen Nanomaterialien und Zellen zu untersuchen. Zwei unterschiedliche Nanomaterialien wurden in dieser Arbeit verwendet: einwandige Kohlenstoffnanoröhren (engl. Single wall carbon nanotube, SWCNT) und nanostrukturierte Hydrogele. In Kapitel 1 wird eine allgemeine Einleitung über das wissenschaftliche Anwendungsfeld von Nanomaterialien wie SWCNTs und nanostrukturierten Hydrogelen gegeben.

Es ist von großem Interesse, Methoden zur Effizienzsteigerung der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) zu erforschen. In Kapitel 2 wird der Einfluß von SWCNT`s auf die PCR durch quantitative Bestimmung der PCR-Produkte mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie (SEM), hochauflösender Transmissionselektronen mikroskopie (HRTEM) und Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) untersucht.

Die Messungen zeigen, daß die Zugabe von SWCNTs bei einer Konzentration von weniger als 3 μ g/ μ l zur Reaktionslösung zu einer Zunahme der PCR- Produkte führt, während höhere Konzentrationen zu einem umgekehrten Effekt führen.



Die PCR hat ein Maximum bei eine SWCNT Konzentration von 3 µg/µl.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Zugabe von Mg²⁺-Additiven zur PCR-Reaktion erhalten. Sowohl SEM- als auch HRTEM-Messungen zeigen, daß die DNA-Template und Taq-Enzyme an SWCNT-Bündel in den PCR-Produkten gebunden sind.

Vergleicht man die XPS-Spektren der Kohlenstoffnanoröhren von vor der Reaktion mit denen nach der Reaktion, so weisen die PCR-Produkte eine höhere C1s-Bindungsenergie auf, wie das Auftreten zweier neuer Signale neben dem Hauptpeak zeigt. Dies weist auf eine chemische Reaktion zwischen SWCNTs und PCR-Komponenten hin.

Letztendlich können folglich SWCNTs in einem Konzentrationsbereich von unter 3 $\mu g/\mu l$ in der Reaktionslösung die PCR-Effizienz erhöhen und haben das Potential in vielfältigen biochemischen Reaktionen als Katalysatoren zu dienen.

Materialien, ähnlich den Nanotubes, werden heute täglich zu hunderten Kilogramm produziert, was zum Aufkommen gesundheitlicher Bedenken führt. Bezüglich Nanopartikel gibt es viele Unsicherheiten um Gesundheit, Sicherheit und Umwelt. Die Toxizität, Epidemiologie, Persistenz und Bioakkumulation von Nanopartikeln muss weiter erforscht werden. Die Effekte von carbon nanotubes auf Zellen und ihre Interaktionsmechanismen zu untersuchen ist daher sehr wichtig. In Kapitel 3 ist eine systematische Studie an menschlichen Fibroblasten in der Gegenwart von aufgereinigten CNTs verschiedener Geometrien und Größen dargestellt. Die Ergebnisse werden mit denen anderer Kohlenstoffmaterialien verglichen. Insbesondere wurde das Überleben der Zellen in Anwesenheit von fünf verschiedenen Kohlenstoffmaterialien untersucht. In der Reihenfolge zunehmender Ordnung sind dies: i) SWCNT, ii) Aktivkohle, iii) Kohlenstoff Schwarzes, iv) mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren und v) Graphit.

Interessanterweise wurde dabei eine starke Abhängigkeit des Zelltods von der Größe, Zeit und Dosis der Kohlenstoffverbindungen festgestellt.



Einfluß von SWCNT auf die Überlebensrate von menschlichen Fibroblasten.

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß bereits Konzentrationen $(25\mu g/ml)$ unter den in der Literatur dargestellten Werten zum Tod der Zellen führen können.

Da Kohlenstoffverbindungen störend auf die Zellmembran wirken und deshalb zur Zellablösung vom Substrat führen können, wurde der Expression von Zellzyklus Adhäsion zusammenhängenden Proteine, wie Laminin, Collagen-IV, Fibronectin, P-Cadherin und focal adhesion Kinase gemessen.

Zuletzt wird ein biologischer Mechanismus dargestellt, der erklärt warum kleinere Partikel, wie z.B. SWCNT, einen größeren Einfluß haben.

In Kapitel 4 wird der Einfluß der SWCNTs auf menschliche HEK293-Zellen untersucht, um Aufschluss über die Biokompatibilität der SWCNTs zu gewinnen.

Die Ergebnisse zeigen, daß SWCNTs die HEK293-Zellproliferation inhibieren können, sowie die Adhäsionseigenschaften der Zellen abhängig von Zeit und Dosis schwächen.



Der Einfluß von SWCNT auf die Lebenfähigkeit von HEK293 Zellen.

HEK293-Zellen zeigen aktive Reaktionen auf SWCNTs, wie die Absonderung verschiedener 20-30 kD schwerer Proteine welche dann die SWCNTs umgeben, als auch die Aggregaion von SWCNTs und die Bildung von knotenförmige Strukturen.

Zellzyklus- Untersuchungen zeigten, dass eine Konzentration an SWCNTs von 25μ g/ml im Zellmedium bei HEK293-Zellen einen G1 Arrest sowie Apoptose hervorrufen.

Biochip Analysen zeigten, dass SWCNTs Hochregulation der Expression von Zellzyklus assoziierten Genen wie *p16*, *, bax, p57, hrk, cdc42* und *cdc37* sowie Herabregulation der Expression von Zellzyklus assoziierten Genen wie *cdk2*, *cdk4, cdk6* und *Cyclin D3* bzw. Herabregulation der Expression von an der Signaltransduktion beteiligter Gene wie *mad2, jak1, ttk, pcdha9* und *erk* bewirken können.

Western blot Analysen zeigten, dass SWCNTs eine verminderte Produktion von mit der Zelladhäsion zusammenhängenden Proteinen wie Laminin, Fibronektin, Cadherin, FAK und Kollagen IV bewirken können.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Herabregulierung von G1 assoziierten Cdks und Cyklinen sowie Heraufregulation von Apoptose assoziierten Genen zu dem von SWCNTs induzierten G1-Phasen-Arrest beitragen. Andererseits können HEK293 Zellen auch aktiv Antworten anschalten, dazu zählt das Ausscheiden von kleinen Proteinen, um die an SWCNT attachierten Zellen von der restlichen Zellmasse zu isolieren. Dieses Phänomen hat potentielle Anwendbarkeit in medizinischer Chemie und Therapie von Krankheiten. Die ausgeschiedenen Proteine sind vielleicht wertvolle Targetmoleküle.

Unsere Ergebnisse können deshalb zukünftige Untersuchungen und die Risikoeinschätzung von SWCNT Einwirkung leiten. Wir bestätigen daher dass die Größe von Kohlenstoffmaterialien ein wichtiger Faktor ist. Da die Nanotechnologie sich anschickt, in großem Maßstab genutzt zu werden, sollten die Gesundheits- und Sicherheitsaspekte von SWCNTs baldigst angegangen werden. Wir denken, dass weitere Cytotoxizitätsstudien darauf abzielen sollten, Grenzwertdosen von SWCNTs verschiedener Größe zu finden. In Zukunft können wir diese Studie verfeinern, indem wir den Durchmesser von carbon nanotubes z.B. via Nanolithographie kontrollieren.

Die Ligandenichte spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion. Allerdings waren bislang Informationen über die strukturelle Anordnung der Liganden nicht zugänglich, da keine Methoden zur Verfügung standen, biofunktionelle Oberflächen mit hoher räumlicher Auflösung zu strukturieren. Spatz entwickelte Oberflächen die eine regelmäßige Strukturierung von Goldpartikeln im Nanometerbereich aufweisen ⁹¹. Diese Technik wurde erfolgreich bei der

Untersuchung von Zelladhäsion angewendet. Die Ligandendichte kann durch diese nanostrukturierten Oberflächen gesteuert werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es die Zellreaktion im Hinblick auf zwei Faktoren zu untersuchen: den Einfluß der Elastizität des Substrates sowie die nanostrukturierte Oberfläche des Substrates auf das Zellverhalten. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit lag in das sich Entwickeln eine Methode für das Studieren von Zellenadhäsion auf Hydrogel. In Kapitel 5 wird eine neue lithographische Methode entwickelt, die sich eines Thiol Ankers bedient, um Nanostrukturen auf weiche Materialien zu übertagen. Diese Mizellen werden homogen auf flachen Substraten, wie Glasdeckgläschen. In einem darauf folgenden Plasma-Prozess werden alle organischen Bestandteile mittels Wasserstoff, Sauerstoff oder Argon entfernt und die monodispersen Au Nanoteilchen erzeugt, deren Größe durch die Menge des zugefügten Ausgangsmaterials bestimmt wird. Der Abstand der Nanoteilchen zueinander wird durch das Molekulargewicht des verwendeten Polymers bestimmt. Die Au Nanopartikel bedecken die Oberfläche homogen in einer quasi-hexagonalen Anordnung Es werden dabei hexagonal geordnete Muster von Gold- Nanopartikeln großflächig auf Glasplättchen erzeugt und unter Beibehaltung der ursprünglichen Ordnung auf Hydrogele transferiert. Das Muster aus Goldpunkten stellt eine Nano- Maske dar, die es ermöglicht, auf der Polymer- Oberfläche an kontrolliert geordneten Positionen Moleküle anzubinden. Die nanostrukturierten Hydrogele werden als Substrate für Zelladhäsionsversuche verwendet, womit die Anwendbarkeit der mizellären Nano- und Soft- Lithographie in diversen Forschungsbereichen gezeigt wird. Unter anderem ermöglicht dieses Verfahren zum Beispiel auf Grund der mechanischen Eigenschaften der generierten Substrate zu erforschen, wie bzw. inwieweit Zellen deformierbare Substrate wahrnehmen und darauf reagieren.

Vorhergehende Studien zeigten, daß Zellenzubehör vom Goldnano-Punktabstand abhing. Daher bestand das zweite Ziel der Arbeit darin, die Rolle der räumlichen Anordnung auf Hydrogel. Die Zellenadhäsion ist auf dem nanostructured hydrogel nachgeforscht worden, das gesteuert werden kann durch Di-blockieren Polymer-Plastik Micelle und Polymer-Plastik Swelling. Dazu wurden REF 52 auf Oberflächen ausplatiert, die eine hochgeordnete Nanostruktierung von 8nm Goldpartikeln im Abstand von 39, 79 und100 nm aufwiesen. Der Raum zwischen den Gold-Nanopartikeln war durch Polyethylenglykol (PEG). Ein zyklisches RGD-Peptid wurde kovalent über eine Thiolgruppe an das Gold gebunden. Jeder Goldpunkt selbst ist so klein, dass nur ein einziger Integrin-Rezeptor anbinden kann. Bis zu einem Abstand von 39nm zwischen den RGD-Peptiden konnte eine gute Ausbreitung und Adhäsion der Zellen. Eine Erhöhung des Goldpunkteabstandes auf über 79nm hatte eine Verringerung der Zellkontakte und eine eingeschränkte Zellausbreitung zur Folge. Dieses hat gezeigt, daß der Abstrand von RGD eine wichtige Rolle bei der Zelladhäzion spielt. Das gleiche Verhältnis zwischen Zellenverhalten und Goldpunktabstand wurde bei Zellen auf weichen nanostrukturierten Oberflächen beobachtet.

Um den molekularen Mechanismus bei welchem die Zelle ein weiches Substrat spürt und auf es reagiert, zu untersuchen, ist es notwendig das Verhältnis zwischen der Genexpression und Weichheit des Substrates zu untersuchen. Dies wird einen Hinweis auf den Regulierungsmechanismus der Genexpression liefern. Es wäre interessant sich auf einige Proteine die mit Zelladhäsion in Beziehung stehen sowie Zellproliferation und Apotopsis zu konzentrieren.