

Toxizität von Graphenoxid: Endoperoxide als Ursache

Hanna Pieper, Serghei Chercheja, Siegfried Eigler, Christian E. Halbig, Milos R. Filipovic und Andriy Mokhir*

Abstract: Potentielle biomedizinische Anwendungen von Graphenoxid (GO), z.B. als Träger von Biomolekülen, Reagenzien für die photothermische Therapie oder Biosensoren, werden durch die Zytotoxizität und Mutagenität dieses Materials eingeschränkt. Es wird davon ausgegangen, dass diese Eigenschaften zumindest zum Teil auf eine von GO verursachte Erhöhung des oxidativen Stresses in Zellen zurückzuführen ist. Es ist jedoch nicht bekannt, auf welchen chemischen Fragmenten dieser ungünstige Effekt beruht. In dieser Arbeit wurden vier GOs entwickelt, welche verschiedene redoxaktive Gruppen wie Mn²⁺, C-zentrierte Radikale sowie Endoperoxide (EPs) auf der Oberfläche besitzen. Der Vergleich der Fähigkeit der Materialien, reaktive Sauerstoffspezies in humanen Gebärmutterhalskrebszellen zu generieren, zeigt, dass EPs eine entscheidende Rolle im GO-induzierten oxidativen Stress spielen. Diese Ergebnisse können für die gezielte Entwicklung von biokompatiblem und nicht-toxischem GO für biomedizinische Anwendungen verwendet werden.

Graphenoxid ist ein einschichtiges Material, das durch die Oxidation von Graphit erhalten werden kann. Es ist wasserlöslich und zellmembranpermeabel. Es wurde gezeigt, dass GO ein effizienter Transporter von sowohl hoch- (Nukleinsäuren, Proteine) als auch niedermolekularen (Antikrebsmittel, Antibiotika) Wirkstoffen ist.^[1] Weiterhin kann es aufgrund seiner starken Absorption im nahem Infrarot-Bereich (NIR) in der photothermischen Therapie oder auch als Biosensor eingesetzt werden.^[2] GO zeigt jedoch oftmals Zytotoxizität und Mutagenität, welche die mögliche Anwendung in der Medizin einschränken.^[3] Verursacht werden diese ungünstigen Eigenschaften durch die Fähigkeit des GO, die zelluläre Membran zu schädigen, mit genomicscher DNA wechselzuwirken und diese zu verändern, sowie die Konzentration an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu erhöhen.^[3,4] Es wurde gezeigt, dass eine gleichzeitige Behandlung von Zellen mit GO und N-Acetylcystein (NAC) die Toxizität von GO verringert.^[4b] Da NAC ein ROS-Fänger ist,

deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der durch GO induzierte oxidative Stress einer der Hauptfaktoren der Toxizität von GO ist. Aus chemischer Sicht ist jedoch nicht klar, welches chemische Fragment (oder Fragmente) für den durch GO induzierten oxidativen Stress verantwortlich ist. Dies ist eine wichtige Frage, da dieses Wissen für die Entwicklung von nicht-toxischem, biokompatiblem GO für biomedizinische Anwendungen genutzt werden kann.

GO besitzt planare Regionen, welche aus einem Netzwerk aus sp²-hybridisierten Kohlenstoffatomen bestehen, sowie nicht-planare Regionen und Ränder, an denen sich Epoxide, Hydroxy-, und Carbonylgruppen^[5] sowie Sulfatester^[6] befinden. Zusätzlich wurden verschiedene redoxaktive Gruppen nachgewiesen oder vorgeschlagen. Insbesondere enthält GO, das mit KMnO₄ oxidiert wurde, C-zentrierte Radikale (C[•]) und Mn²⁺-Ionen.^[8] Die Existenz von Endoperoxiden (EPs) wurde in Ab-initio-Rechnungen^[9] vorhergesagt und durch eine Reihe von indirekten, experimentellen Hinweisen gestützt.^[10] Im Folgenden wird die Beteiligung dieser redoxaktiven Gruppen an der durch GO ausgelösten intrazellulären ROS-Generierung untersucht. Die Anwesenheit von C[•] und Mn²⁺-Ionen auf GO wurde mithilfe von ESR-Spektroskopie untersucht.^[7,8,11] Da für EP noch keine geeignete Analysemethode vorhanden war, wurde von uns eine EP-sensitive fluorogene Sonde entwickelt.

Im ersten Schritt wurde das Protokoll zur Entfernung von Mn²⁺ von GO optimiert.^[12] Es konnte gezeigt werden, dass ein Waschen von GO mit einer Lösung von Ethyldiamin-N,N,N',N"-tetraessigsäure (EDTA) ausreichend ist, um die ESR-aktiven Mn²⁺-Ionen zu entfernen (Abbildung 1 A). Interessanterweise reagiert EDTA nicht mit C[•], was mithilfe des charakteristischen Peaks bei $g = 2.003$ im ESR-Spektrum bestätigt werden konnte. Das so erhaltene Material wird hier GO(-Mn) genannt, um die Abwesenheit von Mn²⁺ anzudeutzen. Die AFM-Analyse von GO(-Mn) zeigt eine ähnliche Morphologie wie das ursprüngliche GO (Abbildung 1 B).^[12] Auch die statistische Raman-Analyse der Intensitäten der D- und G-Banden (I_D , I_G) sowie die Halbwertbreite der 2D-Bande (Γ_{2D}) des Raman-Spektrums des in situ reduzierten GO(-Mn) zeigen, dass die Anzahl an Defekten für das behandelte und unbehandelte GO-Material identisch bleibt: $I_D/I_G = 2.8 \pm 0.2$, $\Gamma_{2D} = 70 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ für GO(-Mn) (Abbildung 1 C) und $I_D/I_G = 3.0 \pm 0.3$, $\Gamma_{2D} = 62 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$ für GO.^[12] Diese Daten belegen, dass EDTA das Kohlenstoffgerüst nicht beschädigt, was eine Bildung von neuen funktionalisierten Enden beinhalten würde. Laut Zhang et al. ist GO in der Lage, Iodid zu oxidieren.^[12c] Dies konnte für GO bestätigt werden, GO(-Mn) konnte dies allerdings nicht mehr. (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen (SI)). Es kann demnach gefolgert werden, dass I⁻ nicht einfach durch die C[•] auf der GO-Oberfläche oxidiert wird,^[7b] sondern diesem

[*] M. Sc. H. Pieper, Dr. S. Chercheja, Prof. Dr. A. Mokhir

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU)
Institut für Chemie und Pharmazie, Organische Chemie II
Henkestraße 42, 91054 Erlangen (Deutschland)

E-Mail: andriy.mokhir@fau.de

Dr. S. Eigler, B. Sc. C. E. Halbig
FAU, Institut für Chemie und Pharmazie und Zentralinstitut für Neue Materialien und Prozesstechnik (ZMP)
Dr.-Mack-Straße 81, 90762 Fürth (Deutschland)

Dr. M. R. Filipovic
FAU, Institut für Chemie und Pharmazie, Bioanorganische Chemie
Egerlandstraße 1, 91058 Erlangen (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507070> zu finden.

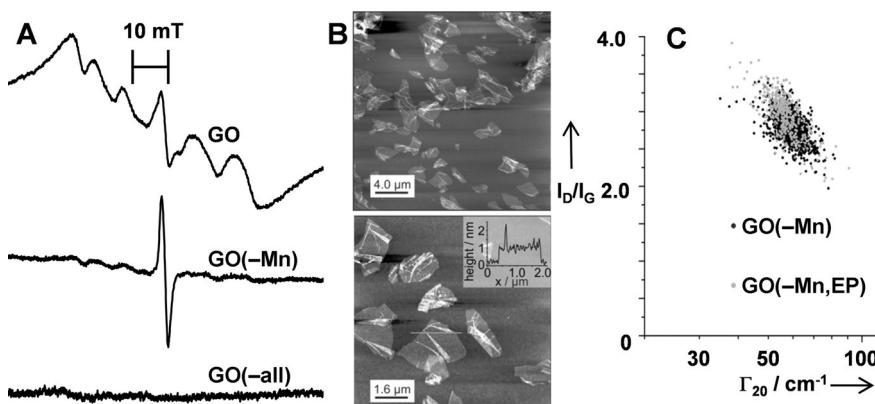


Abbildung 1. A) ESR-Spektren der gefrorenen (-78°C) Suspensionen der GOs in Wasser ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). B) Beispielhaftes AFM-Bild von GO-Mn. C) Spektroskopische Raman-Daten von GO-Mn und GO-Mn-EP, welches in situ zu Graphen reduziert wurde (siehe SI).

Prozess ein komplexerer und von Mn^{2+} abhängiger Mechanismus zugrundeliegt.

Im weiteren Verlauf sollte eine EP-sensitive Sonde entwickelt werden. Da EPs durch Thermolyse in Singulett-Sauerstoff (${}^1\text{O}_2$) umgewandelt werden können,^[13] kann vermutet werden, dass kleine Mengen an ${}^1\text{O}_2$ in der Nähe der auf der Oberfläche gebundenen EPs vorhanden sind. Um diesen ${}^1\text{O}_2$ zu detektieren, wurden von uns in einem ersten Versuch zwei bekannte ${}^1\text{O}_2$ -Fänger verwendet: 4,4'-(Isobenzofuran-1,3-diy)-dibenzoesäure (**P1**)^[14] und 9,10-Di(3-hydroxypropoxy)-anthracen (**P2**).^[15] Sowohl **P1** als auch **P2** zeigten jedoch keine Reaktion mit GO. Um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen, wurde von uns die Sonde Fl-AN-ON (Abbildung 2A) verwendet. Diese besteht aus einem Fluorescein-Derivat (Fl) als Sensorsseinheit, einem 9,10-Dialkoxyanthracen-Linker (AN) als ${}^1\text{O}_2$ -sensitives Fragment^[5] und einem Oligonukleotid (ON) als GO-Bindungseinheit. Im Gegensatz zu den Standard- ${}^1\text{O}_2$ -Fängern bindet Fl-AN-ON aufgrund der starken ON-GO-Wechselwirkungen direkt an das GO.^[16] Hierdurch wird die reaktive Einheit (AN) in die Nähe der EPs auf der GO-Oberfläche gebracht, wodurch die Reaktion zwischen ihnen erleichtert wird.

Der Einbau des Fluorophors in die Sonde senkt die Fluoreszenzquantenausbeute im Vergleich zu freiem Fluorescein um den Faktor 5. Die Bindung der Sonde an GO führt zunächst zu einer Abnahme der Fluoreszenz, gefolgt von einer Zunahme, die auf die Freisetzung des Fluorophors zurückzuführen ist (Abbildungen S2 und S3). Die Spaltung wurde mittels HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt (Abbildung S6, Graph 4). Interessanterweise sinkt die Reaktivität des GO mit seiner

Alterung bei 4°C , bis nach 3 Wochen eine Sättigung dieses Effekts eintritt (Abbildung 2B). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde daher in den weiteren Versuchen GO, welches älter als 3 Wochen war, verwendet. Nach 80 min Inkubation von Fl-AN-ON (100 nm) mit GO ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) erreicht die Fluoreszenz einen Wert von ca. 15, wohingegen eine äquimolare Lösung von Fl einer Fluoreszenzintensität von 35 entsprechen würde. Es kann somit berechnet werden, dass $42 \pm 1 \text{ nm}$ der Sonde in Produkt umgewandelt wurden, was einem EP pro ca. 2×10^4 C-Atomen auf GO entspricht. Diese Schätzung beruht auf der begründeten Annahme, dass die Fluoreszenz des an GO gebundene Fl-AN-

ON vernachlässigbar ist. Es wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz der Modellsubstanz Fl-ON bei einer Bindung an GO vollständig gelöscht wird (Abbildung S2). Die Zugabe von $> 100 \text{ nm}$ Sonde führt nicht zu einer substanzlichen Verstärkung der Spaltreaktion und zeigt somit, dass die Bindung der Probe an GO bei 100 nm gesättigt ist. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass die Aktivierung der Probe praktisch nicht von NaN_3 oder einem Austausch von H_2O zu D_2O (Abbildung S4) beeinflusst wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass, im Gegensatz zu unseren anfänglichen Annahmen, kein ${}^1\text{O}_2$ an der Reaktion beteiligt ist.

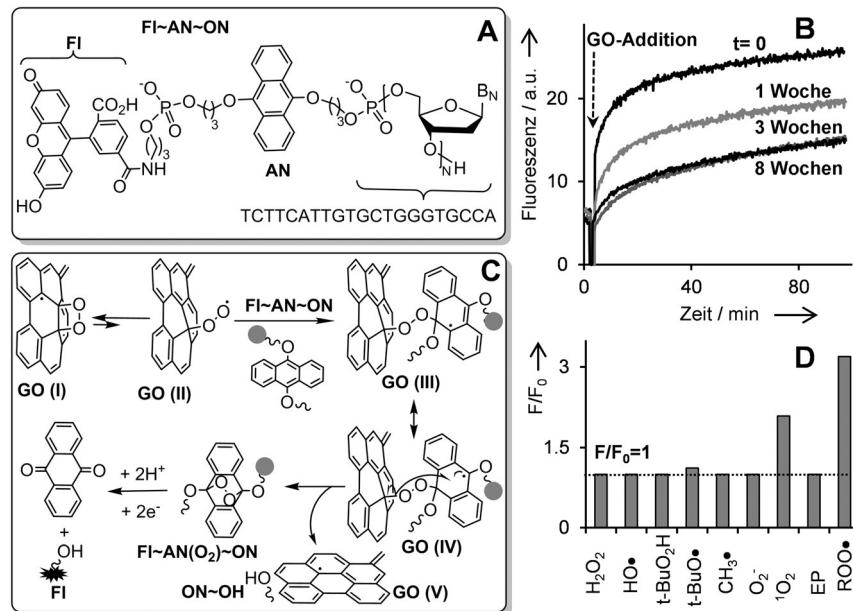


Abbildung 2. A) Struktur von Fl-AN-ON. B) Zunahme der Fluoreszenz der Sonde (100 nm) nach der Zugabe von GO ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), welches nach der Synthese für die angegebenen Zeiten bei 4°C gelagert wurde. C) Ein postulierter Mechanismus der Aktivierung von Fl-AN-ON in der Gegenwart von GO. D) Zunahme der Fluoreszenz (F/F_0) einer Lösung von Fl-AN-ON (100 nm) nach der Reaktion mit verschiedenen ROS; F_0 ist die Fluoreszenz der Lösung vor der Zugabe von ROS und F nach der Zugabe von ROS (weiter experimentelle Beschreibung siehe SI). EP: Endoperoxid. ROO[•]: $\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH}_2^+)(\text{COO})^-(\text{CH}_3)_2$.

Da GO sowohl EPs als auch C[•] trägt (I, Abbildung 2C), kann vermutet werden, dass Peroxyradikale (II) gebildet werden können. Diese können mit der Sonde reagieren, worauf eine Peroxo-überbrückte Spezies III gebildet wird, die durch Delokalisierung stabilisiert wird (IV). Zuletzt kann IV zu Fl~AN(O₂)~ON reagieren, welches unter Abspaltung von Fl zerfällt. Dieser Vorschlag konnte durch experimentelle Ergebnisse gestützt werden, welche bestätigten, dass Fl~AN~ON durch Peroxyradikale ROO[•], welche aus dem Zerfall von α,α' -Azodiisobutyramidindihydrochlorid (AAPH) gebildet wurden, effizient gespalten wird (Abbildung S6, Graph 2). Im Gegensatz dazu ist die Sonde gegenüber anderen redoxaktiven Spezies, welche möglicherweise auf der Oberfläche vorhanden sind, inaktiv (Abbildung 2D). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Modellverbindung 9,10-Di(3-hydroxypropoxyloxy)anthracen durch die durch AAPH gebildeten ROO[•] zu Anthrachinon und 1,3-Propandiol gespalten wird (Abbildung S7).

Die Reaktivität von GO(-Mn) und GO mit Fl~AN~ON ist näherungsweise identisch (Abbildung S8). Dies zeigt, dass die Behandlung von GO mit EDTA die EPs nicht beeinflusst. Da bekannt ist, dass EPs unter UV-Bestrahlung abgebaut werden,^[13] wurde GO(-Mn,EP) durch Bestrahlung von GO-Mn mit UV-Licht hergestellt. GO(-Mn,EP) zeigt eine erheblich geringere Reaktivität mit Fl~AN~ON, was die Entfernung der EPs von der Oberfläche demonstriert (Abbildung S9). Diese Ergebnisse bestätigen die Anwendbarkeit der entwickelten Sonde. Interessanterweise wurde die Intensität des C-spezifischen ESR-Signals durch die UV-Bestrahlung sogar leicht erhöht. Demzufolge besitzt GO(-Mn,EP) keine Mn²⁺-Ionen und EPs mehr, aber immer noch C. Es konnte außerdem von uns gezeigt werden, dass die Behandlung von GO mit einer wässrigen basischen Lösung zur Entfernung aller reaktiven Gruppen inklusive C führt. Dieses Material wurde GO(-all) genannt.

Im letzten Schritt wurde die Fähigkeit der hergestellten GOs, ROS in HeLa-Zellen zu generieren, untersucht. Hierfür wurde 2,7-Dichlorfluoresceindiacetat (DCFH-DA) in Verbindung mit Durchflusszytometrie verwendet (Abbildung 3). Trotz der hohen Zellmembranpermeabilität von GO(-all) wurde für dieses Material bei Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ praktisch keine Beeinflussung der Menge an intrazellulären ROS gefunden. Im Gegensatz dazu führen GO und GO(-Mn), welche eine zweimal niedrigere Zellpermeabilität aufweisen, zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der ROS-Menge in Konzentrationen zwischen 2.5 und 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diese Daten zeigen, dass Mn²⁺ bei der ROS-Generierung in Zellen keine Rolle spielt. Im Gegensatz zu GO und GO(-Mn) führt GO(-Mn,EP) praktisch zu keinem Anstieg der ROS-Menge in Zellen bei Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Daraus kann gefolgert werden, dass oberflächengebundene EPs und nicht Mn²⁺ oder C[•] die Eigenschaft von GO, oxidativen Stress in lebenden Zellen auszulösen, bestimmen. Wie erwartet korrelieren diese Ergebnisse mit der Toxizität der GOs (Abbildung 3).

GOs	C [•] /Mn ²⁺ /EP	Rel. Permeabilität ^[a]	Zellviabilität (%) ^[b]
GO	+/-/+	1	72±3
GO(-Mn)	+/-/+	1.3±0.0	55±8
GO(-Mn,EP)	+/-/-	1.5±0.2	87±10
GO(-all)	-/-/-	2.4±0.4	99±7

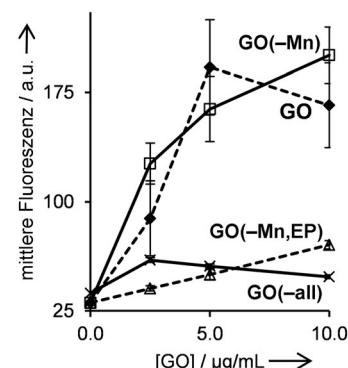


Abbildung 3. Tabelle: Zellpermeabilität der GOs, Effekt der GOs auf die Zellviabilität. [a] die Permeabilität von GO wurde als Referenz genommen; [b] HeLa-Zellen wurden mit GO ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 48 h inkubiert. Graph: GO-induzierter Anstieg der ROS-Konzentration (proportional zur mittleren Fluoreszenz) in HeLa-Zellen (weitere Details siehe SI).

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass auf der Oberfläche gebundene Endoperoxide für den durch Graphenoxid induzierten oxidativen Stress und die Toxizität von GO in HeLa-Zellen verantwortlich sind. Weiterhin wurden Möglichkeiten aufgeführt, diese ungewollten Effekte abzuschwächen, indem das GO mit UV-Licht oder wässriger Base behandelt wird. Diese Ergebnisse werden zukünftige biomedizinische Anwendungen von Graphenoxid erleichtern.

Danksagung

Wir danken der Boehringer Ingelheim Stiftung (PLUS3-Grant für A.M.), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MA1418/8-1, EI 938/3-1, SFB 953) und dem Zentralinstitut für Neue Materialien und Prozesstechnik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Unterstützung dieses Projekts. S.E. dankt Prof. Andreas Hirsch für seine Unterstützung an der FAU Erlangen-Nürnberg.

Stichwörter: Endoperoxide · Graphenoxid · Lebende Zellen · Mangan · Reaktive Sauerstoffspezies

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 405–407
Angew. Chem. **2016**, *128*, 413–416

- [1] a) D. Bitounis, H. Ali-Boucetta, B. H. Hong, D.-H. Min, K. Kostarelos, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 2258; b) L. Feng, Z. Liu, *Nanomedicine* **2011**, *6*, 317; c) X. Sun, Z. Liu, K. Welsher, J. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric, H. Dai, *Nano Res.* **2008**, *1*, 203.
- [2] K. Yang, L. Feng, X. Shi, Z. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 530.
- [3] a) A. B. Seabra, A. J. Paula, R. de Lima, O. L. Alves, N. Duran, *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 159; b) A. Bianco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4986; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5086.
- [4] a) K.-H. Liao, Y.-S. Lin, C. W. Macosko, C. L. Haynes, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2607; b) N. Chatterjee, H.-J. Eom, J. Choi, *Biomaterials* **2014**, *35*, 1109.
- [5] a) W. Cai, R. D. Piner, F. J. Stadermann, S. Park, M. A. Shaibat, Y. Ishii, D. Yang, A. Velamakanni, S. J. An, M. Stoller, J. An, D. Chen, R. S. Ruoff, *Science* **2008**, *321*, 1815; b) T. Szabó, O. Berkesi, P. Forgó, K. Josepovits, Y. Sanakis, D. Petridis, I. Dékány, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2740.

- [6] S. Eigler, C. Dotzer, F. Hof, W. Bauer, A. Hirsch, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9490.
- [7] a) X.-L. Hou, J.-L. Li, S. C. Drew, B. Tang, L. Sun, X.-G. Wang, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 6788; b) L. Yang, R. Zhang, B. Liu, J. Wang, S. Wang, M.-Y. Han, Z. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10109; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10273.
- [8] C. H. A. Wong, Z. Sofer, M. Kubešová, J. Kučera, S. Matějková, M. Pumera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 13774.
- [9] S. Saxena, T. A. Tyson, S. Shukla, E. Negusse, H. Chen, J. Bai, *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *99*, 013104.
- [10] A. A. Vernekar, G. Mugesh, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16699.
- [11] A. M. Panich, A. I. Shames, N. A. Sergeev, *Appl. Magn. Reson.* **2013**, *44*, 107.
- [12] a) S. Eigler, M. Enzelberger-Heim, S. Grimm, P. Hofmann, W. Kroener, A. Geworski, C. Dotzer, M. Rockert, J. Xiao, C. Papp, O. Lytken, H. P. Steinrück, P. Müller, A. Hirsch, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3583; b) S. Eigler, A. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7720; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7852; c) W. S. Hummers, R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1339; d) G. Charpy, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **1909**, *148*, 920–923.
- [13] J.-M. Aubry, C. Pierlot, J. Rigaudy, R. Schmidt, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 668.
- [14] D. Arian, E. Cló, K. V. Gothelf, A. Mokhir, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 288.
- [15] D. Arian, L. Kovbasyuk, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3972.
- [16] W. Wu, R. Kempaiah, P.-J. J. Huang, V. Maheshwari, J. Liu, *Langmuir* **2011**, *27*, 2731.

Eingegangen am 30. Juli 2015

Online veröffentlicht am 9. November 2015