

**Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei der  
proliferativen Signaltransduktion ausgelöst durch  
verbrennungsgenerierte ultrafeine Umweltpartikel in  
Lungenepithelzellen**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Weissenberg

aus Mexiko-Stadt

April 2009

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung  
an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf gGmbH

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Referent: Prof. Dr. J. Abel  
Koreferent: Prof. Dr. P. Proksch  
Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2009

Für all die Menschen, die mir immer gegenwärtig sind  
*Dedicado a todas aquellas personas que tengo siempre presentes*

"[...] So every sweet with sour is tempered still,  
That maketh is be coveted the more;  
For easy things that may be got at will,  
Most sorts of men do set but little store.  
Why then should I account of little pain,  
That endless pleasure shall unto me gain."

(Edmund Spenser, *Sonnet 26*)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Umweltpartikel	2
1.1.1. Definitionen	2
1.1.2. Quellen	4
1.1.3. Zusammensetzung	6
1.2. Gesundheitliche Effekte von Umweltpartikeln	7
1.2.1. Partikelparameter von toxischer Relevanz	9
1.2.1.1. Die "Ultrafein-Hypothese"	10
1.2.1.2. Chemische Zusammensetzung als Modulator von UFP-Effekten	11
1.3. Molekulare Mechanismen der Toxizität ultrafeiner Partikel	16
1.3.1. Partikel in der Lunge	16
1.3.2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	17
1.3.3. Signaltransduktion	20
1.3.4. Modell zum molekularen Mechanismus UFP-induzierter Effekte	25
1.4. Ziel der Arbeit	27
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1. Material	28
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2. Chemikalien	30
2.1.3. Inhibitoren	31
2.1.4. Antikörper	33
2.1.5. Modellpartikel-System	34
2.1.6. Zelllinie	35
2.2. Methoden	36
2.2.1. Zellkultur	36
2.2.1.1. Kultivierung der Zelllinie RLE-6TN	36
2.2.1.2. Belastung der Zellen	36

---

2.2.2. Zytotoxizitätsassay	37
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.3.1. Zellyse und Proteinextraktion	38
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	39
2.2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.3.4. Western Blot Transfer	40
2.2.3.5. Immunologischer Proteinnachweis durch Chemilumineszenz	41
2.2.3.6. Densitometrische Auswertung von Immunsignalen	42
2.2.4. Messung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	42
2.2.4.1. Messung der ROS-Generierung im zellfreien System mittels Fluorometrie	42
2.2.4.2. Messung der ROS-Generierung im zellfreien System durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie)	43
2.2.4.3. Durchflusszytometrische Messung der ROS-Generierung mittels <i>Fluorescence activated cell sorter</i> (FACS)	44
2.2.5. Statistik	45
2.2.6. Abbildungen	45
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1. Induktion der AKT- und ERK1/2-Aktivierung durch Modellpartikel	46
3.2. Unterschiede in den kinetischen Effekten im Vergleich mit CB	49
3.3. Nachweis CB/FS-abhängiger ROS in zellfreien Systemen und intrazellulär	52
3.4. Einfluss der CB/FS-abhängiger ROS auf die AKT- und ERK1/2-Aktivierung: Inhibierung der Signaltransduktionseffekte durch Katalase und SOD	58
3.5. Inhibierung der Signaltransduktionseffekte durch NAC und DPI	61
3.6. Bedeutung von Zelloberflächen-Rezeptoren für die CB/FS-induzierte Signaltransduktion	67
<b>4. Diskussion</b>	<b>76</b>
4.1. Modulatorische Effekte von BaP und FS auf die CB-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung	77

---

4.2. Extra- und intrazelluläre ROS-Bildung und ihr Einfluss auf die CB/FS-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung	80
4.2.1. ROS-Generierung in zellfreiem Medium und intrazellulär	80
4.2.2. Verbindung zwischen extra-/intrazellulären ROS und der CB/FS-induzierten AKT und ERK1/2-Aktivierung	83
4.3. Beteiligung von EGF-Rezeptor und $\beta$ 1-Integrinen an der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung	86
4.4. Einordnung der Arbeit	89
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>6. Summary</b>	<b>93</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>94</b>
<b>Danksagung</b>	<b>118</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>119</b>

## Abkürzungen

∅	Durchmesser
A. dest	destilliertes Wasser
AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
AP-1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AU	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
BaP	Benzo[a]pyren
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C32	Compound 32 (4-[(3-Bromophenyl)amino]-6,7-dimethoxyquinazolin)
C56	Compound 56 (4-[(3-Bromophenyl)amino]-6,7-diethoxyquinazolin)
CAP	<i>concentrated ambient/airborne particles</i> (konzentrierte Umwelt-/Luftpartikel)
(uf)CB	(ultrafeine) Carbon Black-Partikel
CBBaP	Benzo[a]pyren-beschichtete CB-Partikel
CFA	<i>coal fly ash</i> (Kohleflugasche)
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
d <sub>ae</sub>	aerodynamischer Durchmesser
DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
DEP	<i>diesel exhaust particles</i> Diesel-Emissions-Partikel
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure-Natriumsalz
DPI	Diphenyleniodonium-Chlorid
EZM	extrazelluläre Matrix

---

EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGF-R	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ERK	extrazellulär-regulierte Kinasen
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
<i>et al.</i>	und andere
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
FAK	Fokaladhäsions-Kinase
FCS	<i>fetal calb serum</i> (fötales Kälberserum)
FSC	<i>forward light scatter angle</i>
<i>g</i>	Gravitation
GSH/GSSG	Glutathion (reduziert/oxidiert)
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
H <sub>2</sub> DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HBSS+/+	<i>Hank's Buffered Saline Solution</i> +Ca <sup>2+</sup> /+Mg <sup>2+</sup> (gepufferte Kochsalz-Lösung mit Kalzium und Magnesium)
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-8	Interleukin 8
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i> (Integrin-ligierte Kinase)
JNK	Jun N-terminale Kinasen
K-AK	Kontroll-Antikörper
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEK oder MKK	MAP-Kinasen-Kinasen
MKKK	MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen
NAC	N-Acetyl-Cystein
$\beta$ -NADH	beta-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

---

NF- $\kappa$ B	nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
NP	Nanopartikel
o. g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	<i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i> (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe)
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalz-Lösung
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PM	<i>particulate matter</i> (Schwebstaub)
PM <sub>2,5</sub>	feine Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 2,5 $\mu$ m)
PM <sub>10</sub>	granuläre Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 10 $\mu$ m)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Redox	Reduktion-Oxidation
rel.	relative
RLE-Zellen	Rattenlungenepithel-Zellen
ROFA	<i>residual oil fly ash</i> (residuale Ölflugasche)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
SSC	<i>side light scatter angle</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Unit (1 $\mu$ mol Stoffumsatz/min)
u. a.	unter anderem
UFP	ultrafeine Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 100 nm)
V	Volt

---

vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent (Volumen/Volumen)
z. B.	zum Beispiel

Die Abkürzungen von chemischen Elementen, Verbindungen und Aminosäuren erfolgten nach der IUPAC-Nomenklatur.

## 1. Einleitung

Der Begriff "Feinstaub" ist in den letzten Jahren vermehrt Gegenstand öffentlicher Diskussionen. Dies ist nicht zuletzt auf die durchgeführten politischen Maßnahmen zur Reduzierung von Luftschadstoffen zurückzuführen. Dazu gehören die von der Europäischen Union festgelegten Immissionsgrenzwerte für Partikel in der Luft (Richtlinie 1999/30/EG). Mit der 22. Bundes-Immissionsschutzverordnung (22.BImSchV, 2002) wurde die europäische Luftqualitätsrichtlinie in deutsches Recht umgesetzt. Danach beträgt der ab dem 1. Januar 2005 einzuhaltende Tagesmittelwert für Feinstaubpartikel  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , bei 35 zugelassenen Überschreitungen im Kalenderjahr. Der Jahresmittelwert ab 2005 sollte  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  betragen.

Die Notwendigkeit zur Reduzierung der Staubbelastung ergibt sich aus den schweren gesundheitlichen Wirkungen auf den Menschen, wie sie zahlreiche Untersuchungen weltweit zeigen (Weltgesundheitsorganisation, *World Health Organisation*, WHO 2006). Umweltpartikel, die ein komplexes, sich räumlich und zeitlich veränderndes Gemisch darstellen, lösen demnach pathogene Effekte in verschiedenen Populationen aus. Die aktuellen Grenzwerte basieren jedoch auf der Staubmasse, was ein gleiches Gesundheits-Gefährdungspotential für alle Partikel voraussetzt, unabhängig von den physikalischen Charakteristika und der chemischen Zusammensetzung (Schwarze *et al.* 2006). Auch wenn diese durch Studienergebnisse als toxikologische Determinanten impliziert werden, muss die Verbindung zwischen spezifischen Eigenschaften und Gesundheitseffekten noch identifiziert werden (US-Umweltschutzbehörde, *US Environmental Protection Agency*, USEPA 2004; US Nationaler Forschungsrat, *National Research Council*, NRC 2004). Folglich sind epidemiologische und experimentelle Studien notwendig, die sich systematisch mit den Effekten einzelner Partikelparameter und chemischer Komponenten befassen (Schwarze *et al.* 2006; WHO 2006).

Die Ergebnisse solcher Studien sind von zusätzlicher umwelt- und arbeitsmedizinischer Bedeutung in Anbetracht der Fortschritte und des Wachstums der modernen Nanotechnologie, bei der Partikel industriell hergestellt werden, die physikalische und/oder chemische Gemeinsamkeiten mit ultrafeinen Umweltpartikeln aufweisen, und daher gleichermaßen potentiell toxisch sind (Oberdörster *et al.* 2007).

## 1.1 Umweltpartikel

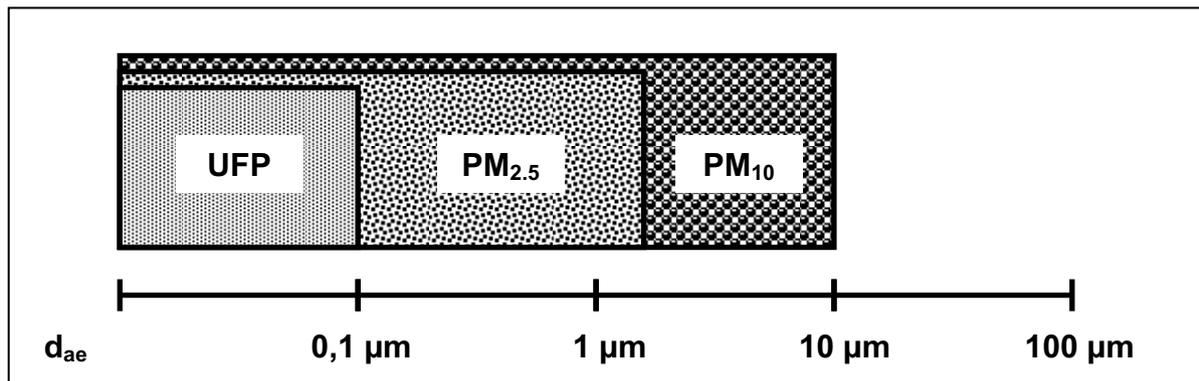
### 1.1.1 Definitionen

Als Umwelt- oder Schwebstaubpartikel gelten alle festen und flüssigen Teilchen, die in der Luft suspendiert sind, unabhängig von ihrer Zusammensetzung. In der englischsprachigen Literatur wird Schwebstaub als "*particulate matter*" (PM) bezeichnet (Lahl & Steven 2005; UBA 2005). Für gegenwärtige regulatorische Zwecke wird PM, gemäß der von der USEPA (1987, 1997) festgelegten und von der WHO (2000) sowie der EU (1999) übernommenen Standards, nach dem aerodynamischen Durchmesser  $d_{ae}$  eingeteilt<sup>1</sup>, da die Partikelgröße ein kritischer Parameter für die Wahrscheinlichkeit und den Ort der Deposition innerhalb der Atemwege darstellt (WHO 2006). Die Staubpartikel lassen sich der Größe nach in folgende Fraktionen einteilen (Abb. 1.1):

PM <sub>10</sub> :	Teilchen, die einen gröÙenselektierenden Lufteinlass passieren, der für einen aerodynamischen Durchmesser von 10 µm eine Abscheidewirksamkeit von 50% hat (EU-Richtlinie 1999/30/EG).
Grobe ( <i>coarse</i> ) Partikel:	Teilchen größer als 2,5 µm, aber kleiner als 10 µm, entspricht Partikeln zwischen PM <sub>10</sub> und PM <sub>2.5</sub> .
PM <sub>2.5</sub> (feine Partikel):	Teilchen kleiner als 2,5 µm.
UFP (ultrafeine Partikel):	Teilchen kleiner als 0,1 µm (100 nm)

---

<sup>1</sup> Der  $d_{ae}$  eines Teilchens beliebiger Form, chemischer Zusammensetzung und Dichte ist gleich dem Durchmesser einer Kugel mit der Dichte 1 g/cm<sup>3</sup>, welche in ruhender oder wirbelfrei strömender Luft die selbe Sinkgeschwindigkeit hat wie das betrachtete Teilchen (UBA 2005).



**Abb. 1.1** Einteilung der PM-Fractionen nach ihrem aerodynamischen Durchmesser (verändert nach Brook *et al.* 2004). Per Definition sind UFP immer eine Teilmenge von  $PM_{2.5}$ , und diese ihrerseits eine Teilmenge von  $PM_{10}$ . Nicht gezeigt ist die sog. *coarse* Fraktion, die die Differenz aus  $PM_{10}$  und  $PM_{2.5}$  bildet.

$PM_{10}$  schließt inhalierbare Partikel ein, die klein genug sind, um in die Thoraxregion vorzudringen. Die  $PM_{2.5}$ -Fraktion kann mit hoher Wahrscheinlichkeit bis zu den Alveolen gelangen (Donaldson & Stone 2003; WHO 2006).

Ultrafeine Partikel (UFP) haben einen geringen Massenanteil an Hintergrund-PM (Hughes *et al.* 1998). Dieser Anteil kann sich jedoch während Perioden mit hoher Luftverschmutzung oder an stark befahrenen Straßen vervielfachen (Brand *et al.* 1991; Shi *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2002). UFP treten in hohen Zahlen auf, da die Partikelzahl bei einer konstanten Konzentration in der Luft ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) mit abnehmendem Durchmesser drastisch zunimmt. Im ultrafeinen Bereich ( $< 100 \text{ nm } \varnothing$ ) steigt damit der Anteil der Moleküle, die sich an der Oberfläche befinden, exponentiell an (Oberdörster *et al.* 2005). An dieser vergrößerten Partikeloberfläche können sich große Mengen von Verunreinigungen, oxidierenden Gasen, organischen Stoffen und Übergangsmetallen anlagern (Oberdörster 2001). Die hohe Depositionseffizienz von UFP in der Lunge, ihre große Oberfläche und die adsorbierten Übergangsmetalle werden in der Herz- und Lungen-Toxikologie als wichtig erachtet (Gwinn & Vallyathan 2006).

Im Zuge der sich seit den 1990er Jahren entwickelnden Nanotoxikologie, die sich mit den Effekten und potentiellen Risiken von partikelförmigen Strukturen unter 100 nm Größe beschäftigt, erscheint es notwendig, den Begriff Nanopartikel in diesem Kontext als eine andere Form von UFP zu definieren (Oberdörster *et al.* 2005, 2007). Als Nanopartikel bezeichnet man allgemein beabsichtigt erzeugte Strukturen, die durch chemische und/oder physikalische Prozesse hergestellt werden. Dadurch

werden ihnen spezifische Eigenschaften und Funktionen verliehen, welche im makroskopischen Bereich nicht vorhanden wären (Gwinn & Vallyathan 2006).

So wie UFP bestehen auch industriell hergestellte Nanopartikel (NP) aus primären Partikeln unter 100 nm Größe<sup>2</sup>, mit einer großen Oberfläche und einer entsprechend hohen potentiellen Oberflächenreaktivität. Beide tendieren dazu (in Gasen oder Flüssigkeiten suspendiert), Agglomerate zu bilden, in Abhängigkeit von der Konzentration, den chemischen Eigenschaften der Partikeloberfläche und des Suspensionsmediums (Oberdörster *et al.* 2007). Sie können aber auch miteinander verschmelzen (Aggregat-Bildung) und anschließend agglomerieren, wobei größere Partikel entstehen. Die meisten Umwelt-UFP und einige industrielle Nanopartikel (z.B. Carbon Black und TiO<sub>2</sub>) werden als Aggregate produziert, die anschließend agglomerieren (Bansal *et al.* 1993; Beaucage *et al.* 1999; Baan *et al.* 2006).

### 1.1.2 Quellen

Die Quellen von PM sind mannigfaltig (Tab. 1.1) und entsprechend komplex und variabel ist die PM-Zusammensetzung. Allgemein wird zwischen natürlichen und anthropogenen (von Menschen verursachten) Quellen unterschieden. Letztere lassen sich weiter unterteilen in Quellen, die Partikel unbeabsichtigt oder beabsichtigt generieren.

Des Weiteren können primäre und sekundäre Quellen sowie die jeweiligen Partikel identifiziert werden (Lahl & Steven 2005; UBA 2005). Bei den primären Quellen entstehen die Partikel unmittelbar in diesen und werden von ihnen freigesetzt. Hierzu zählen die in Tabelle 1.1 aufgeführten stationären und mobilen Quellen, bei denen Partikel durch thermische (Verbrennung, Verdampfung) oder mechanische Einwirkung (z. B. Abrieb) generiert werden, und die meisten natürlichen Quellen. In den sekundären Quellen entstehen reaktionsfähige Gase, die über chemische Reaktionen in der Atmosphäre zu sekundären Partikeln werden, und an den primären Partikeln gebunden werden können. Die Hauptquellen für sekundäre Partikel sind stationäre Verbrennungsanlagen (Energie, Industrie, Hausbrand), Landwirtschaft, (petro-) chemische Industrie, Vulkane und die biologische Aktivität in Böden und Gewässern. Manche Quellen sind somit gleichzeitig primär und sekundär.

---

<sup>2</sup> Zur deutlicheren Unterscheidung werden als NP Strukturen bezeichnet, die in wenigstens einer Dimension kleiner als 100 nm sind, UFP dagegen in allen drei Dimensionen (Kreyling *et al.* 2006).

<b>Partikelquellen</b>		
<b>Natürlich</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vulkane und deren Gasemissionen</li> <li>• Meeressalzaerosole in Küstenregionen</li> <li>• Bodenerosion, Verwitterung von Gesteinen und Mineralien, Ferritin</li> <li>• Wald- und Buschfeuern</li> <li>• Biologisches organisches Material: Pollen, Sporen, Mikroorganismen (Pilze, Bakterien, Viren)</li> <li>• Feuchtgebiete, Sümpfe</li> <li>• Biologische Bodenaktivität</li> <li>• Biogenes Magnetit</li> </ul>
<b>Anthropogen</b>	Unbeabsichtigt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verbrennungsanlagen zur Energieversorgung (Kraftwerke, Fernheizwerke)</li> <li>• Biomasse- und Abfallverbrennungsanlagen</li> <li>• Hausbrand (Gas-, Öl-, Kohleverbrennung, Kochen, Frittieren, Grillen, Zigarettenrauch)</li> <li>• Industrieprozesse (Metall-, Stahlerzeugung, Sinteranlagen, Schweißvorgänge, Polymerherstellung)</li> <li>• Schüttgutumschlag</li> <li>• Straßenverkehr (vorrangig Diesel-betriebene Fahrzeuge)</li> <li>• Abrieb der Reifen, Bremsen und Kupplungsbeläge</li> <li>• Abrieb des Straßenbelags und wieder aufgewirbelter Straßenstaub</li> <li>• Schienen-, Schiff- und Luftverkehr</li> <li>• Landwirtschaft</li> <li>• Lösemiteileinsatz</li> <li>• Chemische und petrochemische Industrie</li> </ul>
	Beabsichtigt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Technisch entwickelte Nanopartikel:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kontrollierte Größe und Form, entwickelt für Funktionalität: Metalle, Semikonduktoren, Metalloxide, Kohlenstoff, Polymere in Form von Nanosphären, -drähten, -nadeln, -röhrchen, -schalen, -ringen, -plättchen</li> <li>- Unbehandelte und beschichtete Partikel</li> <li>- Nanotechnologie angewandt auf Konsumgüter: Kosmetika, Medikamente, Lebensmittel, Textilien, Elektronik, Optik, Anzeigen (Displays), usw.</li> </ul> </li> </ul>

**Tab. 1.1** Beispiele zu natürlichen und anthropogenen Quellen von PM/Nanopartikeln. Primäre und sekundäre Quellen werden nicht gesondert vermerkt, siehe dazu Text (zusammengestellt und verändert nach Oberdörster *et al.* 2005; UBA 2005; Schwarze *et al.* 2006).

### 1.1.3 Zusammensetzung

Umweltpartikel sind ein dynamisches und komplexes Gemisch aus unterschiedlich großen Partikeln, deren Zusammensetzung von vielen Faktoren abhängt, und fortlaufend verändert werden kann. Der Beitrag zur PM-Zusammensetzung aus den oben aufgeführten Quellen variiert z. B. mit der Tages- und Jahreszeit, mit den geographischen Gegebenheiten (urbane oder ländliche Landschaft, Bodeneigenschaften, Gewässer) und nicht zuletzt mit dem Klima (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Wind, Sonneneinstrahlung). Daraus ergeben sich räumlich und (jahres-) zeitlich abhängige Variationen in den Konzentrationen der vorhandenen Stoffe und den Eigenschaften der resultierenden Partikel (Kim *et al.* 2005; Peng *et al.* 2005; Cassee *et al.* 2003).

Es ist dennoch möglich Hauptkomponenten zu identifizieren, die in PM verschiedener Regionen der Welt mehr oder weniger konstant auftreten (Tab. 1.2). In Europa beispielsweise bestehen  $PM_{10}$  und  $PM_{2.5}$  im Jahresmittel hauptsächlich aus Sulfaten, Nitraten, organischem Material und Mineralien aus der Erdkruste. Elementarer Kohlenstoff bildet je nach Messstation zwischen 5 und 20 % von  $PM_{2.5}$  (Putaud *et al.* 2004). In ähnlicher Form bilden in Nordamerika organischer und elementarer Kohlenstoff sowie Ammonium-Sulfat und -Nitrat die Hauptbestandteile von  $PM_{2.5}$ , welches bis zu 90% von  $PM_{10}$  ausmachen kann (McMurry *et al.* 2004).

Im Allgemeinen befindet sich in der groben Fraktion ( $PM_{10} - PM_{2.5}$ ) Material aus der Erdkruste, während  $PM_{2.5}$  und die ultrafeine Fraktion vorwiegend aus kohlenstoffhaltigen Partikeln aus Verbrennungsprozessen bestehen. Ebenfalls aus (stationären und mobilen) Verbrennungsquellen entstehen kondensierte Metalle und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) (Schwarze *et al.* 2006). Sulfate, Nitrate und sauerstoffhaltige Kohlenwasserstoffe entstehen als sekundäre Partikel durch oxidative Reaktionen in der Atmosphäre aus den Vorläufergasen Schwefeldioxid ( $SO_2$ ), Stickstoffoxiden ( $NO_x$ ), Ammoniak ( $NH_3$ ) und flüchtigen Kohlenwasserstoffen (Lahl & Steven 2005). Weiterhin stellt das biologische Material einen wichtigen Teil von PM dar: Endotoxine, Bakterien, beta-Glykane, Pilzsporen, Allergene und Pollen. Dabei kommen Endotoxine vorwiegend in der groben und weniger in der feinen Fraktion vor (Ormstad *et al.* 1998; Monn & Becker 1999; Park *et al.* 2000; Soukup & Becker 2001; Bauer *et al.* 2002; Dales *et al.* 2004; Hetland *et al.* 2005).

<b>Zusammensetzung von PM</b>	
Anorganisch	Organisch
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elementarer Kohlenstoff (<i>black carbon</i>)</li> <li>• Sulfate</li> <li>• Nitrate</li> <li>• (Übergangs-) Metalle</li> <li>• Mineralien aus der Erdkruste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (<i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>, PAH)</li> <li>• Flüchtige Kohlenwasserstoffe (Aldehyde, Ketone, Chinone, Aliphaten)</li> <li>• Endotoxine</li> <li>• Beta-Glykane</li> <li>• Bakterien, Pilzsporen, Allergene, Pollen</li> </ul>

**Tab. 1.2** Anorganische und organische Stoffe, die in veränderlicher Konzentration die Hauptkomponenten von PM bilden (zusammengestellt aus Lahl & Steven 2005; Schwarze *et al.* 2006; UBA 2005; WHO 2006)

## 1.2 Gesundheitliche Effekte von Umweltpartikeln

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden negative gesundheitliche Auswirkungen im Zusammenhang mit der Exposition zu erhöhten Partikelkonzentrationen in der Umwelt bzw. am Arbeitsplatz beobachtet. Beschrieben werden beispielsweise akute inflammatorische Effekte in der Lunge nach beruflicher Exposition zu Zink- bzw. Quarzstaub in den 1920er – 1930er Jahren (Oberdörster *et al.* 2007). Eine Erhöhung der kardio-respiratorischen Morbidität und Mortalität während Perioden extremer Luftverschmutzung in den 1930er und 1950er Jahren ist ebenso gut dokumentiert (Alfaro-Moreno *et al.* 2007): So z. B. nach mehrtägig anhaltendem Smog im Jahre 1930 im belgischen Maas-Tal (Nemery *et al.* 2001) sowie im Dezember 1952 in London (Ashby 1987), mit jeweils 63 und über 4000 Toten. Es handelte sich dabei in der Mehrheit um Menschen ab dem mittleren Alter mit bereits vorhandenen Herz-Kreislauf- und Atemwegs-Erkrankungen. Es wird daher seit langer Zeit vermutet, dass Umweltpartikel nicht nur durch Lungen-, sondern auch durch Herz-Krankheiten einen frühzeitigen Tod herbeiführen können.

Die negativen Auswirkungen von PM auf die menschliche Gesundheit werden bei den heute vergleichsweise niedrigeren Partikelkonzentrationen in den Städten weiterhin beobachtet, und es scheint keinen Schwellenwert zu geben (Brunekreef & Holgate 2002). In anderen Worten: Es besteht ein Hintergrundniveau an partikel-

bedingten Krankheiten, welches mit den (z. B. klimatischen) Veränderungen der Partikelkonzentration in der Luft direkt proportional ansteigt bzw. wieder zurückgeht. Im Prinzip können alle beruflich und umweltbedingt exponierten Menschen von partikelabhängigen Gesundheitseffekten betroffen sein. Besonders anfällige Bevölkerungsgruppen sind jedoch Kinder, ältere Menschen und Individuen mit bereits vorhandenen Herz-Lungen-Dysfunktionen, Asthma oder Influenza (Pope 2000). Aber auch Diabetes scheint die Anfälligkeit zu erhöhen (O'Neill *et al.* 2005), genauso wie Fettleibigkeit, Bluthochdruck und eine gewisse genetische Prädisposition (Schwartz *et al.* 2005).

Erwartungsgemäß sind in erster Linie die Atemwege und vor allem die Lunge von der Partikelbelastung betroffen. Neben chronischer Bronchitis kann das Auftreten von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) sowie allgemein eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion durch chronische Partikelexposition hervorgerufen werden (Schikowski *et al.* 2005). Eine Verschlimmerung von asthmatischen Symptomen tritt in Zusammenhang mit einer Erhöhung der Partikelbelastung in der Atemluft auf, was sich auf die pro-inflammatorische Wirkung der Partikel zurückführen lässt (Donaldson *et al.* 2000). Und schließlich wird eine Dauerexposition zu verbrennungsgenerierten Partikeln als ein wichtiger Umwelt-Risikofaktor für Lungenkrebs-Mortalität angesehen (Pope *et al.* 2002).

Das Auftreten bzw. die Verschlechterung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Folge von erhöhten Partikelkonzentrationen in der Luft sind ebenfalls gut dokumentiert. Während Perioden starker Luftverschmutzung steigt beispielsweise das Risiko eines Herzinfarktes (Peters *et al.* 2001) sowie anderer kardiovaskulärer Effekte wie Herzrhythmusstörungen, Gehirnschlag und plötzlicher Tod (Brook *et al.* 2004; Schulz *et al.* 2005).

Epidemiologische Studien belegen zudem partikelbedingte Effekte auf das Immunsystem. So besteht eine erhöhte allergische Sensibilisierung auf Pollen-Allergenen nach jahrelanger Exposition zu Umweltpartikeln in städtischen Bereichen mit hohem Verkehrsaufkommen (Wyler *et al.* 2000).

Wenn auch heute die Beziehung zwischen Partikelexposition und dem Auftreten von gesundheitlichen Effekten unbestritten ist, so ergeben sich Diskrepanzen hinsichtlich der Identifizierung der pathologischen Determinanten von Umweltpartikeln. Die epidemiologischen und experimentellen Daten diesbezüglich sind zwar limitiert, sie

deuten jedoch auf die besondere Rolle der Partikelgröße und der chemischen Zusammensetzung als toxisch relevante Eigenschaften hin (Delfino *et al.* 2005; Schwarze *et al.* 2006; WHO 2006).

### 1.2.1 Partikelparameter von toxischer Relevanz

Die Komplexität und Variabilität in der Zusammensetzung von Umweltpartikeln erschwert die Identifizierung der potentiell toxischen PM-Komponenten, die zur Entzündung, respiratorischen Erkrankungen und kardiovaskulären Effekten beitragen (Mossman *et al.* 2007). Die Erforschung spezifischer Partikelfractionen (definiert durch physikalische oder chemische Eigenschaften) und ihre Beziehung zu Gesundheitseffekten ist relativ begrenzt (WHO 2006). Die meisten Hinweise stammen bisher aus toxikologischen *in vivo* und *in vitro* Studien, die mit Hilfe von Modellpartikeln (Surrogaten) bzw. größenselektierten PM-Proben aus der Luft verschiedene Charakteristika (z. B. Größenverteilung, Anteil an wasserlöslichem oder organischem Material) auf physiologische und zelluläre Effekte untersucht haben. Inzwischen herrscht Einigkeit darüber, dass die Größe ein wesentlicher Parameter für die Partikeltoxizität darstellt. Der Fraktion der ultrafeinen Partikel (UFP) wird in diesem Kontext das höchste toxische Potential zugeschrieben. UFP bilden eine der Hauptkomponenten der urbanen Luftverschmutzung, und entstehen in der Regel aus Verbrennungsprozessen (Industrie, Straßenverkehr, Haushalt, usw.). Dabei wird eine Reihe von festen und gasförmigen Stoffen freigesetzt, welche sich zusammenlagern bzw. miteinander reagieren können, um neue Partikel zu bilden. Die höhere Pathogenität der UFP nach deren Inhalation kann durch ihre große Oberfläche pro Maßeinheit, einen proportional höheren Gehalt an toxischen Übergangsmetallen und organischen Kohlenwasserstoffen sowie die Fähigkeit, ins Lungengewebe (und darüber hinaus) einzudringen, erklärt werden (Donaldson *et al.* 2005). Die chemische Zusammensetzung der verbrennungsgenerierten UFP stellt somit den zweiten toxischen Parameter dar. Der anteilige Effekt der einzelnen Partikelbestandteile an der Gesamt-Partikeltoxizität und die möglichen Interaktionen untereinander sind Gegenstand der aktuellen Forschung, wodurch ein Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Toxikologie von UFP geleistet wird.

### 1.2.1.1 Die "Ultrafein-Hypothese"

Erste Hinweise auf die besonders hohe Toxizität von ultrafeinen Partikeln lieferten vergleichende *in vivo* Studien mit ultrafeinem (20 nm Ø) und feinem (250 nm Ø) Titandioxid (TiO<sub>2</sub>), einem bis dahin als nicht-toxisch angesehenen Stoff. Ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel verursachen eine stärkere Entzündungsreaktion in der Rattenlunge als die feinen Partikel, wenn sie in derselben Dosis intratracheal instilliert werden (Ferin *et al.* 1990). Die ausgelöste Entzündung korreliert am besten mit der Oberfläche der Partikel, und weniger mit der Partikelmasse, -volumen oder -zahl (Oberdörster *et al.* 1992).

Die Erkenntnisse aus diesen und ähnlichen Untersuchungen, das Wissen über das Vorhandensein einer ultrafeinen Partikelfraktion als Teil der Partikelwolke und die epidemiologisch belegten gesundheitlichen Effekte von Luftverschmutzung führten Mitte der 1990er Jahre zur Aufstellung einer so genannten "Hypothese der ultrafeinen Partikel" (Oberdörster *et al.* 2007). Danach spielen die in der städtischen Luft immer anwesenden UFP eine Rolle bei der Ursache von akuten Lungenschäden in empfindlichen Teilen der Bevölkerung (Oberdörster *et al.* 1995). Des Weiteren wurde postuliert, dass eine von UFP ausgelöste alveoläre Entzündung Mediatoren freisetzt, die eine Verschlechterung von Lungenerkrankungen und eine Erhöhung der Blutgerinnung in empfindlichen Individuen verursachen. Damit ließe sich der beobachtete Anstieg der Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Zusammenhang mit erhöhter Luftverschmutzung erklären (Seaton *et al.* 1995).

Seit der Formulierung der Ultrafein-Hypothese hat nur eine limitierte Zahl von epidemiologischen und klinischen Studien an freiwilligen Versuchspersonen eine Verbindung zwischen Umwelt-UFP und dem Risiko von negativen gesundheitlichen Effekten in anfälligen Teilen der Bevölkerung hergestellt (Oberdörster *et al.* 2005; WHO 2006). Allerdings sind direkte Korrelationen mit UFP-Messungen nicht immer möglich, da solche Daten oft nicht vorhanden sind. Vielmehr werden in einigen Fällen Parameter herangezogen, die indirekt den Rückschluss auf die Beziehung der beobachteten Effekte zu UFP zulassen. Solche Parameter sind beispielsweise die Konzentration an PM<sub>2.5</sub>, Partikelzahlen, oder allgemein die Exposition zu Quellen, in denen ein bekanntermaßen hoher Anteil an UFP zu finden ist, wie etwa dem Straßenverkehr.

Beschrieben sind UFP-bedingte Effekte auf die Partikeldeposition und -entfernung (*clearance*) sowie auf Inhalationsparameter bei Menschen mit vorhandenen Herzgefäß- bzw. Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD (Brown *et al.* 2002; Pekkanen *et al.* 1997, 2002; Peters *et al.* 1997). Des Weiteren zeigt sich ein erhöhtes Risiko von Herzinfarkt bei Erwachsenen (Peters *et al.* 2004) und von atopischen Erkrankungen und allergischer Sensibilisierung bei Kindern (Morgenstern *et al.* 2008) nach akuter bzw. chronischer Exposition gegenüber Umweltpartikeln im Straßenverkehr. Ein Zusammenhang zwischen der Mortalität aufgrund kardiovaskulärer und respiratorischer Erkrankungen und der Konzentration an feinen und ultrafeinen Partikeln in der Luft konnte durch epidemiologische Studien in den USA und Europa bereits belegt werden (Laden *et al.* 2000, Wichmann *et al.* 2000).

Weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen bestätigten den Befund, dass UFP in der Lunge stärker inflammatorisch wirken, als feine Partikel mit derselben chemischen Zusammensetzung. Dies gilt auch dann, wenn die feinen Partikel aus schwerlöslichen, gering toxischen Materialien stammen (Li *et al.* 1996, 1997, 1999; Donaldson *et al.* 2002). Eine der treibenden Kräfte dabei bildet offenbar die große Partikeloberfläche (Oberdörster *et al.* 2005). Wie diese Eigenschaft von UFP eine Entzündung auslöst, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird u. a. angenommen, dass an der stark vergrößerten Partikeloberfläche katalytische Reaktionen ablaufen, die zur Bildung von toxischen freien Radikalen und folglich zum zellulären Stress im Organismus führen (Donaldson & Stone 2003).

### **1.2.1.2 Chemische Zusammensetzung als Modulator von UFP-Effekten**

Auch wenn die Größe – und damit die spezifische Oberfläche – ein wichtiger Parameter der Partikeltoxizität darstellt, lässt sie sich im Umweltkontext von der chemischen Zusammensetzung der Partikel nicht trennen. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die chemische Reaktivität von Partikelbestandteilen durch die spezifische Partikeloberfläche verändert oder moduliert wird.

Die Partikel mit dem höchsten toxischen Potential stammen vorwiegend aus der Verbrennung fossiler Energiequellen und sind der ultrafeinen Fraktion zuzuordnen (Donaldson *et al.* 2005). Sie agglomerieren leicht, womit die Partikelzahl sinkt, ihre Oberflächen-Dosis bleibt aber wahrscheinlich unverändert. Diese Emissionen weisen in der Regel einen hohen Gehalt an elementarem und organischem Kohlenstoff

sowie einige Metalle auf. Der chemische Vorgang der Pyrolyse generiert eine Reihe komplexer organischer Moleküle, von denen einige zusammen mit Nanopartikeln aus elementarem Kohlenstoff erhalten bleiben können. Letztere bilden dann in der Regel den unlöslichen Partikelkern, an den sich lösliche Substanzen anlagern. Der Verbrennungsprozess konzentriert Metalle aufgrund der thermischen Degradation der organischen Fraktion, die soweit fortschreitet, wie die Verbrennungseffizienz es ermöglicht. Die Ausgangsstoffe und die Art der Verbrennung bestimmen schließlich die Partikeleigenschaften, wie die chemische Zusammensetzung, Größe und Löslichkeit.

Experimentelle Studien haben Hinweise auf die Toxizität einzelner chemischen Stoffgruppen und deren Mechanismus geliefert. Für solche Untersuchungen sind unterschiedliche Partikel verwendet worden, z.B. PM-Proben aus einer bestimmten Messstation bzw. konzentrierte Luftpartikel (*concentrated ambient/airborne particles*, CAP), oder aber verbrennungsgenerierte Modellpartikel, die bis zu einem gewissen Grade standardisiert sind: Dieselruß-Partikel (*diesel exhaust particles*, DEP), Flugasche aus Öl- oder Kohleverbrennung (*residual oil fly ash*, ROFA; *coal fly ash*, CFA) und Carbon Black (industriell hergestellte feine bzw. ultrafeine Kohlenstoff-Partikel). Letztere Gruppe ist als Modell insofern geeignet, als dass sie Partikel mit einer relevanten Stellung im Rahmen der persönlichen Umwelt- und beruflichen Exposition darstellt. So treten z. B. DEP als häufigste verbrennungsgenerierte Partikel in urbanen Gebieten auf (Donaldson *et al.* 2005).

Die geeignete Fraktionierung der Partikel ermöglicht deren Analyse nach Kriterien, die eine Verbindung zwischen der chemischen Zusammensetzung und den ausgelösten physiologischen bzw. zellulären Effekten erlaubt. So können beispielsweise wasserlösliche und -unlösliche Komponenten getrennt, die organische Fraktion extrahiert oder Metalle cheliiert werden. Auf dieser Weise konnten Einblicke in die Toxizität und Pathogenität der verschiedenen Bestandteile verbrennungsgenerierter UFP gewonnen werden.

Der Partikelkern aus elementarem Kohlenstoff stellt vorwiegend den unlöslichen Teil des gesamten Gemisches dar. Wie schon beschrieben, bieten unlösliche ultrafeine Partikel eine große katalytische Oberfläche zur Bildung von freien Radikalen. Diese werden für die Entstehung von oxidativem Stress verantwortlich gemacht, welcher als grundlegende und vorantreibende Mechanismus der partikelinduzierten Entzündung angesehen wird (Duffin *et al.* 2002). Für den löslichen Teil der Partikel

gelten die von der Oberfläche abgelösten Metalle oder organische Stoffe als der primäre pro-inflammatorische Mechanismus. Die Anwesenheit von Übergangsmetallen ist eine verbreitete Hypothese für die PM-Toxizität aufgrund der Entstehung von freien Radikalen über Fenton-Reaktionen (Dreher 2000; Smith *et al.* 1997), während PAH zur inflammatorischen Wirkung von PM beitragen können (Garcon *et al.* 2001; Chin *et al.* 1998). Beide Stoffgruppen können in der Lunge an komplexen, zyklischen Reaktionen (Redox-Reaktionen) beteiligt sein, die ebenfalls zur Entstehung von freien Radikalen führen (Rice *et al.* 2001; Squadrito *et al.* 2001).

### Der Partikelkern

Ultrafeines Carbon Black (ufCB) besteht aus gering löslichen Kohlenstoff-Nanopartikeln, die aus der unvollständigen thermischen Dekomposition von Kohlenwasserstoffen industriell hergestellt wird (BéruBé *et al.* 2007). Es wird in der Partikeltoxikologie verbreitet eingesetzt, als Beispiel für Partikel mit geringer Löslichkeit und intrinsischer Toxizität, ohne relevante Verunreinigungen durch Metalle oder organische Substanzen (Heinrich *et al.* 1995; Donaldson *et al.* 2005). Es dient damit als Modell für den Partikelkern von verbrennungsgenerierten UFP.

Diverse epidemiologische wie experimentelle Studien haben gesundheitliche, physiologische und zelluläre Effekte beschrieben, die sich allein auf die Kohlenstoffpartikel zurückführen lassen. Bei beruflich exponierten Menschen in der CB-Produktion zeigen sich z. B. Erkrankungen der Atemwege und radiologische Veränderungen (Gardiner *et al.* 2001; van Tongeren *et al.* 2002). In der Ratte wurden pro-inflammatorische Effekte nach akuter Belastung durch Inhalation bzw. Instillation von ufCB-Partikel beobachtet (Gilmour *et al.* 2004; Renwick *et al.* 2004). Langzeit-Studien haben eine Beziehung zwischen der auftretenden Entzündung nach chronischer Partikelexposition und der Entwicklung von Lungentumoren in der Ratte aufgestellt (Driscoll 1996). Die krebserregende Wirkung von ufCB in Tierversuchen wird allerdings mit einem Überladungseffekt<sup>3</sup> (*overload effect*) in Verbindung gebracht (Mauderly *et al.* 1994; Valberg & Watson 1996).

---

<sup>3</sup> Der Überladungs- bzw. Überlastungseffekt bezeichnet eine Situation, in der ein großer Teil der Lunge mit einer sehr hohen Dosis an gering löslichen, gering toxischen Partikeln konfrontiert ist. Dies führt zum Versagen des Entfernungsmechanismus (*clearance*), Auftreten von Entzündung und schließlich Fibrose und Krebs (Tran *et al.* 2000).

Auf zellulärer Ebene ist ufCB u. a. in der Lage, oxidativen Stress und die Expression pro-inflammatorischer Gene auszulösen (Shukla *et al.* 2000), Phagozytose bei niedriger Dosis zu stimulieren, und bei hoher Dosis zu inhibieren (Renwick *et al.* 2001).

Auch kardiovaskuläre Effekte wie Anzeichen von oxidativem Stress im menschlichen Blutplasma (Sorensen *et al.* 2003) sowie eine veränderte Herzrhythmus-Regulation bei Mäusen (Tankersley *et al.* 2004) werden mit der Partikelexposition assoziiert.

Studien mit anderen Modellpartikeln sind bezüglich inflammatorischer und kanzerogener Wirkung in der Lunge sowie kardiovaskulärer Effekte zu ähnlichen Ergebnissen gekommen, wenn auch eine Korrelation ausschließlich mit dem kohlenstoffhaltigen Partikelkern nicht immer gegeben ist. DEP verursacht Lungenentzündung und -tumore in der Rattenlunge (Heinrich *et al.* 1995). Es konnte dafür eine Beziehung zum unlöslichen Partikelanteil, aber auch zur organischen und metallischen Fraktion gezeigt werden (Baeza-Squiban *et al.* 1999; Ball *et al.* 2000). Studien an jungen gesunden Menschen fanden einen Zusammenhang zwischen akuter arterieller Vasokonstriktion und dem in CAP befindlichen elementaren wie auch organischem Kohlenstoff (Brook *et al.* 2002; Urch *et al.* 2004). Die inflammatorische und zytotoxische Wirkung von Flugasche wird für die ultrafeine Fraktion auf die Kohlenstoffkerne zurückgeführt, obwohl diese Partikelsorte u. a. bioverfügbare Übergangsmetalle enthält (Gilmour *et al.* 2004).

Insgesamt belegen die Studien die besondere Rolle des Partikelkerns in der Toxizität und Pathogenität von UFP, und deuten auf die Wichtigkeit der großen reaktiven Partikeloberfläche als treibende Kraft hin (Duffin *et al.* 2002; Tran *et al.* 2000).

### Die organische Fraktion

Organische Kohlenstoffverbindungen können einen beträchtlichen Massenanteil von PM ausmachen. Dabei handelt es sich um ein heterogenes Gemisch aus flüchtigen und nicht-flüchtigen Substanzen, wie z. B. Benzol, Xylol und PAH. Zurzeit gibt es jedoch ungenügende epidemiologische Belege für den Beitrag spezifischer organischer Komponenten in Bezug auf PM-induzierte gesundheitliche Effekte in der Gesamtbevölkerung. Der epidemiologische Beweis für die krebserregende Wirkung von organischen Verbindungen stammt hauptsächlich aus Studien bei beruflicher Exposition (Schwarze *et al.* 2006; WHO 2006).

Verschiedene experimentelle Studien schreiben die biologischen Effekte verbrennungsgenerierter Partikel den daran gebundenen organischen Stoffen zu. Hierbei werden in erster Linie PAH (z. B. Benzo[a]pyren) betrachtet, da sie erwiesenermaßen potente Kanzerogene darstellen. Die organische PM-Fraktion kann zudem reaktive Verbindungen wie z. B. Chinone enthalten, oder aber zu solchen metabolisiert werden. Diese können über Redox-Zyklen reaktive Sauerstoffspezies generieren, und damit an der Entstehung von partikelinduziertem oxidativen Stress beteiligt sein (Squadrito *et al.* 2001).

Die Arbeiten mit organischen Extrakten aus DEP oder PM-Proben weisen darauf hin, dass partikelgebundene organische Verbindungen in einer Reihe biologischer Effekte involviert sein können. Darunter finden sich zytotoxische (Hiura *et al.* 1999), genotoxische (Brits *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2003) und vor allem pro-inflammatorische Effekte (Bonvallot *et al.* 2001; Li *et al.* 2000; Nel *et al.* 2001).

### Übergangsmetalle

Die metallischen Komponenten von PM können regional sehr unterschiedlich sein, und selbst innerhalb einer Region können Gehalt und Sorte variieren. Als toxikologisch relevant haben sich einige der im Periodensystem als Übergangsmetalle bezeichnete Elemente erwiesen, beispielsweise Nickel (Ni), Eisen (Fe), Kupfer (Cu), Zink (Zn) und Vanadium (V) (Mossman *et al.* 2007, Schwarze *et al.* 2006). Übergangsmetalle, und davon insbesondere das Fe, können in PM-Proben in hohen Konzentrationen vorliegen, und aufgrund ihrer oxidativen Aktivität eine Rolle in der Entstehung biologischer bzw. gesundheitlicher Effekte spielen (Gilmour *et al.* 1996). Hohe Metallkonzentrationen in der Luft finden sich vor allem in städtischen Ballungsräumen und Industriegebieten. In diesem Kontext konnte der Zusammenhang zwischen dem Gehalt an (Übergangs-) Metallen und dem Auftreten akuter Atemwegseffekte epidemiologisch belegt werden (Roemer *et al.* 2000; Schaumann *et al.* 2004). Ebenso ist der Beweis für die Beteiligung von Metallen an der PM-abhängigen Morbidität und Mortalität der Bevölkerung gegeben (Burnett *et al.* 2000; Ghio 2004; Laden *et al.* 2000).

Der Beitrag der metallischen Fraktion an vorwiegend pro-inflammatorischen Wirkungen von Partikeln infolge von oxidativem Stress ist durch verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien nachgewiesen worden. So verursachen metallhaltige Extrakte

aus PM-Proben oder ROFA akute Lungen-Schäden und -Entzündung in der Ratte (Dreher *et al.* 1997; Dye *et al.* 2001). Die Expression und Ausschüttung von Zytokinen *in vitro* werden durch lösliche Metalle (Metall-Ionen) induziert. Dies konnte u. a. durch Vorbehandlung der eingesetzten Extrakte mit Metall-Komplex-Bildnern gezeigt werden (Carter *et al.* 1997; Frampton *et al.* 1999; Jimenez *et al.* 2000; Molinelli *et al.* 2002).

Damit gibt es ausreichende Hinweise darauf, dass Übergangsmetalle wie auch organische Stoffe eine modulierende Wirkung auf die gesamte PM-induzierte Toxizität und Pathogenität ausüben können.

### **1.3 Molekulare Mechanismen der Toxizität ultrafeiner Partikel**

#### **1.3.1 Partikel in der Lunge**

Umweltpartikel gelangen hauptsächlich durch Inhalation in den Organismus. Im Prinzip kann die Partikelablagerung (Deposition) in allen Bereichen der Atemwege erfolgen, von der Nase über Rachen, Luftröhre und Bronchien bis hin zu den Alveolen. Die Wahrscheinlichkeit für den Ort der Deposition hängt dennoch entscheidend von der Partikelgröße ab (Bair 1995). Für UFP mit einem Durchmesser zwischen 10 und 100 nm gilt demnach eine hohe Depositionswahrscheinlichkeit im alveolären Raum.

Auf dem Lungenepithel treten Partikel zunächst mit den Schleimhäuten in Kontakt. Der weitere Verlauf wird dann von der Löslichkeit der Partikelkomponenten bestimmt. Lösliche Stoffe diffundieren ab, und können je nach Substanz von den Epithelzellen absorbiert, metabolisiert und eventuell weiter transportiert werden. Über den Blutkreislauf und das lymphatische System können sie dann zu anderen Organen gelangen (Kreyling *et al.* 2006). Gering lösliche Partikel werden in der Regel von alveolären Makrophagen aufgenommen und über den mukoziliären Transport aus der Lunge entfernt (Kreyling & Scheuch 2000). Experimentelle Studien deuten jedoch darauf hin, dass UFP von Makrophagen weniger effizient erkannt, phagozytiert und abtransportiert werden, als größere Partikel. Die Folge ist eine gesteigerte Interaktion mit den Epithelzellen. Darüber hinaus kann eine Translokation der Partikel ins

Interstitium und weiter eine systemische Ausbreitung erfolgen (Oberdörster *et al.* 2005).

Ultrafeine Partikel sind in der Lage, ins Innere der Zellen zu gelangen. Damit haben sie direkten Zugang zu intrazellulären Organellen, Proteinen und DNA, was ihr toxisches Potential deutlich erhöht (Geiser *et al.* 2005). Für die Aufnahme von UFP in die Zelle werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die aktiv (z. B. Pinozytose, Endozytose) oder passiv (Diffusion, Penetration, adhäsive Interaktion) ablaufen. Diese Prozesse sind in diversen experimentellen Arbeiten untersucht worden, die in der Summe auf keinen einheitlichen, für alle UFP gemeinsamen Mechanismus verweisen (Geiser *et al.* 2005; Matsuo *et al.* 2003). Letztlich hängt die Partikelaufnahme sowie die danach induzierten molekularen Effekte von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Partikel selbst, der Ziel-Zellsorte und des umgebenden Mediums ab (Unfried *et al.* 2007).

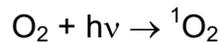
### 1.3.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Wie in den vorigen Abschnitten bereits beschrieben, basiert die gegenwärtige Hypothese zur UFP-Toxizität auf dem auftretenden oxidativen Stress infolge einer gesteigerten, partikelabhängigen Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (Donaldson *et al.* 2005, Nel *et al.* 2006). Darunter wird eine Gruppe von Molekülen gefasst, die aus der Aktivierung von Sauerstoff ( $O_2$ ) durch Energie- oder Elektronen-Transfer entstehen (Klotz 2002; Unfried *et al.* 2007). ROS können einerseits azellulär aus den intrinsischen reaktiven Partikeleigenschaften hervorgehen, und andererseits durch Stimulation zellulär gebildet werden. Ferner unterscheiden sich primäre, partikelabhängige von sekundären, Entzündungs-bedingten ROS (Knaapen *et al.* 2004).

Unabhängig von ihrem Ursprung und ihrer Natur führt eine erhöhte ROS-Bildung jenseits der antioxidativen Kapazität der Zelle zur Schädigung von Biomolekülen (Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren). Doch auch bei geringen Konzentrationen sind ROS in der Lage, auf die zelluläre Signaltransduktion einzuwirken. Inflammatorische Prozesse, Proliferation und Zelltod werden infolgedessen beeinflusst (Unfried *et al.* 2007).

### Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ )

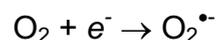
Das  $^1\text{O}_2$  ist kein Radikal, sondern eine elektronisch angeregte Form von molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), die durch Energie-Transfer, z.B. Licht-Einwirkung, entsteht:



Nanopartikel können als Photokatalysatoren wirken, und so die Bildung von  $^1\text{O}_2$  begünstigen. Beispiele hierzu sind Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) und Fullerene ( $\text{C}_{60}$ ) (Konaka *et al.* 1999; Yamakoshi *et al.* 2003). Die photochemische Reaktivität von UFP ist jedoch im Rahmen der Lungentoxikologie von geringer Bedeutung.

### Superoxid-Radikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

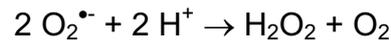
Es entsteht durch die Übertragung eines Elektrons ( $e^-$ ) auf ein Sauerstoffmolekül (Reduktion):



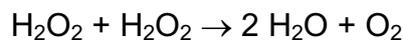
Im biologischen System kann die Reaktion u. a. durch spezifische enzymatische Katalyse (z. B. NADPH-Oxidasen), als Seitenreaktion des Elektronen-Transports während der mitochondrialen Atmungskette oder im Laufe von Reduktions- und Oxidations-Zyklen (Redox-Reaktionen) ablaufen. Letzteres kann bei der Freisetzung organischer Stoffe aus verbrennungsgenerierten UFP auftreten. So sind Chinone bekanntlich in der Lage, Redox-Zyklen einzugehen. Einige PAH können zudem durch metabolisierende Enzyme der Phase I zu Chinonen oder anderen Redox-aktiven Verbindungen umgesetzt werden (Squadrito *et al.* 2001; Xia *et al.* 2004.). Eine physikalische Interaktion von UFP mit redoxaktiven sub-zellulären Strukturen kann außerdem Auswirkungen auf die Generierung von Superoxid und weiteren ROS haben. Membrangebundene Enzymkomplexe wie NADPH-Oxidasen oder ganze Organellen wie Mitochondrien können somit in ihrer Integrität, Funktion und Regulation beeinflusst werden (Li *et al.* 2003, Unfried *et al.* 2007; Xia *et al.* 2006).

### Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Die Disproportionierung (Dismutation) von Superoxid kann spontan oder enzymatisch katalysiert durch Superoxid-Dismutasen erfolgen, und führt in jedem Fall zur Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



Die Zelle verfügt über eine antioxidative Maschinerie, um dem oxidativen Potential des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entgegenzuwirken, indem es zu H<sub>2</sub>O reduziert wird. Dies geschieht durch spezifische Enzyme wie Glutathion-Peroxidase und Katalase (Epp *et al.* 1983; Seidman *et al.* 1999). Im ersten Fall wird Glutathion (GSH) als Reduktionsäquivalent, im zweiten ein weiteres H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Molekül als Elektronen-Donor verwendet:

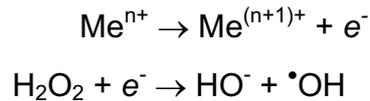


Das Wasserstoffperoxid wird im Laufe des normalen zellulären Metabolismus in geringen Konzentrationen kontinuierlich gebildet und zerstört. Neben dem zytotoxischen Potential werden ihm daher auch regulatorische Funktionen als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) zugesprochen (Rhee 1999).

Die Entstehung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch verschiedene UFP und Nanopartikel ist sowohl in zellfreien als auch in *in vitro* Systemen gezeigt worden (Wilson *et al.* 2002). Doch abgesehen von der zentralen Stellung der Partikeloberfläche als Katalysator ist der genaue molekulare Mechanismus der Entstehung noch nicht vollständig geklärt (Donaldson *et al.* 2005; Knaapen *et al.* 2004).

### Hydroxyl-Radikal (\*OH)

In Gegenwart eines Übergangsmetall-Ions in der reduzierten Form (Me<sup>n+</sup>), z. B. Fe<sup>2+</sup>, kann eine unvollständige Reduktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eintreten, was zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen führt (Fenton-Reaktion):



Das Hydroxyl-Radikal gilt als die reaktivste oxidierende Spezies und Initiator von Radikal-Kettenreaktionen mit diversen Biomolekülen. Ultrafeine Umweltpartikel sind in der Lage, in zellfreien Systemen und *in vitro* Hydroxyl-Radikale zu generieren. Vorwiegend werden sie mit genotoxischen Effekten in Verbindung gebracht (Borm *et al.* 2007; Knaapen *et al.* 2004, Shi *et al.* 2003, 2006).

### 1.3.3 Signaltransduktion

In Verbindung mit dem ausgelösten oxidativen Stress sind Partikel in der Lage, intrazelluläre Signaltransduktionswege zu aktivieren. Dies geschieht unter Beteiligung von Zellmembran-Rezeptoren und führt zur Induktion der entsprechenden zellulären Endpunkte. Zu den relevanten partikelinduzierten Endpunkten zählen die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine sowie Veränderungen in der Zell-Proliferation und Apoptose, welche durch die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Albrecht *et al.* 2004; Unfried *et al.* 2007).

#### Transkriptionsfaktoren

Bei den partikelinduzierten zellulären Antworten spielen Redox-regulierte Transkriptionsfaktoren, in erster Linie das Aktivatorprotein-1 (AP-1) und der nukleären Transkriptionsfaktor Kappa B (NF- $\kappa$ B), eine wichtige Rolle. Deren Aktivierung kann die Proliferations- und Apoptose-Rate verändern. Sie haben zudem Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Wachstumsfaktoren (z. B. dem Transformierenden Wachstumsfaktor beta, TGF- $\beta$ ) und Zytokinen, beispielsweise Interleukin 8 (IL-8), Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) (Albrecht *et al.* 2004). In Epithelzellen ist die Beteiligung von AP-1 und NF- $\kappa$ B an der UFP-bedingten Ausschüttung von Zytokinen und Induktion von Proliferation gezeigt worden (Barlow *et al.* 2005; Timblin *et al.* 2002).

## EGF-Rezeptor

Die Signalkaskaden zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren können durch Zellmembran-gebundene Tyrosin-Kinase-Rezeptoren reguliert werden. Insbesondere der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGF-R) zeigt sich als ein wichtiger Vermittler der partikelinduzierten Signaltransduktion (Albrecht *et al.* 2004). Der EGF-R ist ein Glykoprotein, dessen Aktivierung zum einen durch Ligandenbindung (z. B. epidermaler Wachstumsfaktor, EGF; Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor, HB-EGF; Amphiregulin), zum anderen durch oxidativen Stress erfolgen kann (Abdelmohsen *et al.* 2003; Fickova 2002). Dabei wird die Dimerisierung des EGF-R induziert, was die Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten in der Kinase-Domäne und somit die Aktivierung der intrinsischen Tyrosin-Kinase bewirkt. Die phosphorylierten Stellen werden von Adapterproteinen erkannt, die das Phosphorylierungssignal in einer Kette von Kinase-Reaktionen intrazellulär weiterleiten. Die EGF-R-vermittelte Signaltransduktion kann in verschiedene Endpunkte münden. So ist sie an der Regulation zellulärer Ereignisse wie Wachstum, Differenzierung, Überleben, Proliferation, Adhäsion, und Genexpression beteiligt (Fickova 2002; Yamanaka *et al.* 2003).

Diverse Studien mit PM und verbrennungsgenerierten UFP an Lungenepithelzellen haben die Beteiligung des EGF-R an partikelinduzierten Endpunkten gezeigt. Partikel sind somit in der Lage, Proliferation (Tamaoki *et al.* 2004; Timblin *et al.* 2002) und Apoptose (Matsuo *et al.* 2003) zu induzieren. Damit verbunden ist der partikelbedingte oxidative Stress von entscheidender Bedeutung. Ultrafeine Partikel können zudem eine verstärkte Expression von EGF-R-Liganden wie HB-EGF bewirken (Blanchet *et al.* 2004). Es entsteht dabei eine autokrine Aktivierungsschleife, die mit einer erhöhten Proliferationsrate verbunden ist (Marano *et al.* 2002; Tamaoki *et al.* 2004).

## MAP-Kinasen

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt, und nehmen in der partikelinduzierten Signaltransduktion eine zentrale Stellung ein. Zudem ist die EGF-R-vermittelte

Aktivierung von MAP-Kinasen durch Partikel ausschlaggebend für die Induktion von Proliferation und Apoptose. (Unfried *et al.* 2007).

Es handelt sich dabei um eine Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen, die durch verschiedene extrazelluläre Reize (z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Entzündung, Stress) aktiviert werden. Sie vermitteln Signalkaskaden von der Zelloberfläche zum Kern, wobei die resultierenden Effekte mitunter entgegengesetzt sind. MAP-Kinasen werden in mehreren Unterfamilien eingeteilt. Dazu gehören die Extrazellulär-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2), die Jun N-terminalen Kinasen/Stress-aktivierten Proteinkinasen 1 und 2 (JNK/SAPK1/2), p38 und ERK5 (Johnson & Lapadat 2002). Die Aktivierung von MAP-Kinasen erfolgt durch Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosin-Resten, und wird von MAP-Kinasen-Kinasen (MKK oder MEK) katalysiert. Diese werden ihrerseits von MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MKKK, z. B. Raf) ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert (Cobb & Goldsmith 1995). Verschiedene Studien mit unterschiedlichen Partikelsorten (DEP, PM, Quarz, Kohlenstaub) haben die Aktivierung von MAP-Kinasen bzw. deren Beteiligung an partikelinduzierten Endpunkten gezeigt (Albrecht *et al.* 2002; Shukla *et al.* 2001; Wu *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2004). Welche Signalwege für einen gegebenen Endpunkt spezifisch aktiviert werden, ist allerdings bisher nicht vollständig geklärt. Ferner sind mögliche Interaktionen der MAP-Kinasen-Signalkaskaden miteinander und mit anderen Signalwegen nach Partikelexposition bislang wenig untersucht worden (Albrecht *et al.* 2004).

### Integrine

Die physikalische Partikel-Zell-Interaktion kann als ein weiterer Mechanismus zur Einleitung von Signalkaskaden angesehen werden (Albrecht *et al.* 2004). Das erste Ziel für eine solche Interaktion mit den Partikeln ist die extrazelluläre Matrix (EZM), die mit Integrinen in direktem Kontakt steht. Integrine sind Transmembran-Rezeptoren, die die Verbindung zwischen EZM und dem Zytoskelett bilden. Es handelt sich dabei um Glykoprotein-Heterodimere, die aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind. Es sind bisher 18 verschiedene  $\alpha$ - und 8 verschiedene  $\beta$ -Ketten bekannt, aus deren Kombinationsmöglichkeiten die jeweilige Ligandenbindungsspezifität hervorgeht (Gary *et al.* 2003; Smith *et al.* 1990). Die repetitive

Aminosäure-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD), die in verschiedenen EZM-Proteinen (Fibronectin, Kollagen, Vitronectin) vorhanden ist, bildet die Bindungsstelle für Integrine (Aplin *et al.* 1998; Cheresch 1987). Nach Ligandenbindung erfolgt eine Zusammenlagerung der Integrin-Rezeptoren in der Zellmembran mit einer nachfolgenden Konformationsänderung. Dieser als "Clustering" bezeichnete Prozess führt zur Bildung von sogenannten Fokaladhäsionskomplexen mit dem Zytoskelett und Signalproteinen, beispielsweise der Fokaladhäsions-Kinase pp125<sup>FAK</sup> (FAK) und der "integrin-linked kinase" (ILK) (Lafrenie & Yamada 1996). Als Transmembran-Verbindung besitzen Integrine eine Funktion als Adhäsions-Rezeptoren, indem sie z. B. strukturelle Veränderungen der EZM erkennen. Integrine sind aber auch in der Lage, im Zusammenspiel mit den an ihnen gebundenen Proteinen eine Signalübertragung sowohl vom extrazellulären Raum ins Zellinnere ("*outside-in signaling*") als auch in umgekehrter Richtung ("*inside-out signaling*") zu vermitteln (Giancotti & Rouslahti 1999). Entsprechend vielfältig sind die von Integrinen regulierten Endpunkte, darunter Proliferation, Apoptose, Überleben und Differenzierung (Hynes 1992).

Über die Rolle von Integrinen an partikelinduzierten Effekten ist bislang wenig bekannt. Hinweise dafür stammen hauptsächlich aus Untersuchungen mit Asbestfasern. So sind Integrine beispielsweise in der asbestinduzierten Apoptose und Mesotheliom-Kanzerogenese involviert (Sandhu *et al.* 2000a, 2000b).

### Proteinkinase B (AKT)

Die Proteinkinase B, auch AKT genannt, ist ein weiteres Signaltransduktionsprotein, das in Zusammenhang mit membranvermittelten Effekten von Xenobiotika über oxidativen Stress diskutiert wird (Barthel & Klotz 2005). Dabei handelt es sich ebenfalls um eine Serin/Threonin-Kinase, die an der Regulation mehrerer Zellfunktionen beteiligt ist, wie z. B. Überleben, Proliferation, Motilität und Expression pro-inflammatorischer Zytokinen (Abraham 2005). Die AKT-Aktivierung erfolgt in starker Abhängigkeit von den Phosphatidylinositol-3 Kinasen (PI3K), einer Gruppe von intrazellulären zellmembrangebundenen Enzymen (Woodgett 2005). Nach Aktivierung durch Tyrosin-Kinase- oder G-Protein-assoziierten Rezeptoren katalysiert PI3K u. a. die Bildung des Lipid-Mediatoren Phosphatidylinositol-3-phosphat (PIP3). Diese interagieren mit AKT und weiteren Proteinen, wodurch die Aktivierung von

AKT erfolgt. Dabei ist für eine vollständige Aktivität die aufeinanderfolgende Phosphorylierung der Aminosäuren Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> essentiell (Leevers *et al.* 1999). Eine Reihe von Substraten werden von AKT erkannt, phosphoryliert und dadurch inhibiert, darunter die Glucosylsynthase-Kinase-3 (GSK-3) und pro-apoptotische Mediatoren (Brazil *et al.* 2004; Doble & Woodgett 2003; Woodgett 2005). Damit wirkt der PI3K/AKT-Signalweg anti-apoptotisch und treibt die Zellzyklus-Progression an.

In der Regel wird die Induktion des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges mit der Bindung an Wachstumsfaktoren, und bei Beteiligung von Integrinen mit mechanischen Stimuli in Verbindung gebracht (Abraham 2005; Alenghat & Ingber 2002). Die AKT-Aktivität erweist sich als relevant bei der Inhibierung von Anoikis, einer besonderen Form von Apoptose, die durch die Ablösung der Zelle von der EZM induziert wird (Frisch & Francis 1994). Hierbei spielen Integrine eine zentrale Rolle in der Signalvermittlung, die zur AKT-Aktivierung führt (King *et al.* 1997). Als mögliche Mediatoren hierfür werden die bereits genannten Proteine FAK und ILK sowie Mitglieder der Src-Kinasen diskutiert (Delcommene *et al.* 1998; Shen & Guan 2001; Troussard *et al.* 2003).

Bis heute gibt es wenige Belege für eine Beteiligung von AKT an der partikelinduzierten Signaltransduktion. Hinweise darauf lieferten *in vitro* Studien mit Asbestfasern an Mesothelzellen. Diese zeigten eine gleichzeitige Aktivierung von ERK1/2 und AKT, die durch  $\beta$ 1-Integrine vermittelt wird (Berken *et al.* 2003).

### Zusammenspiel von Signaltransduktionswegen

Im Kontext der zelladhäsionsabhängigen Proliferation ist die kooperative Wirkung von EGF-R und  $\beta$ 1-Integrine auf die nachfolgende Signaltransduktion bereits bekannt. Dabei konnte neben einer integrinabhängigen EGF-R-Phosphorylierung eine physikalische Interaktion beider Membranrezeptoren nachgewiesen werden (Moro *et al.* 1998). In Epithelzellen hat diese Interaktion einen Einfluss auf die Zellzyklus-Regulation über AKT und die MAP-Kinasen ERK1/2 (Bill *et al.* 2004).

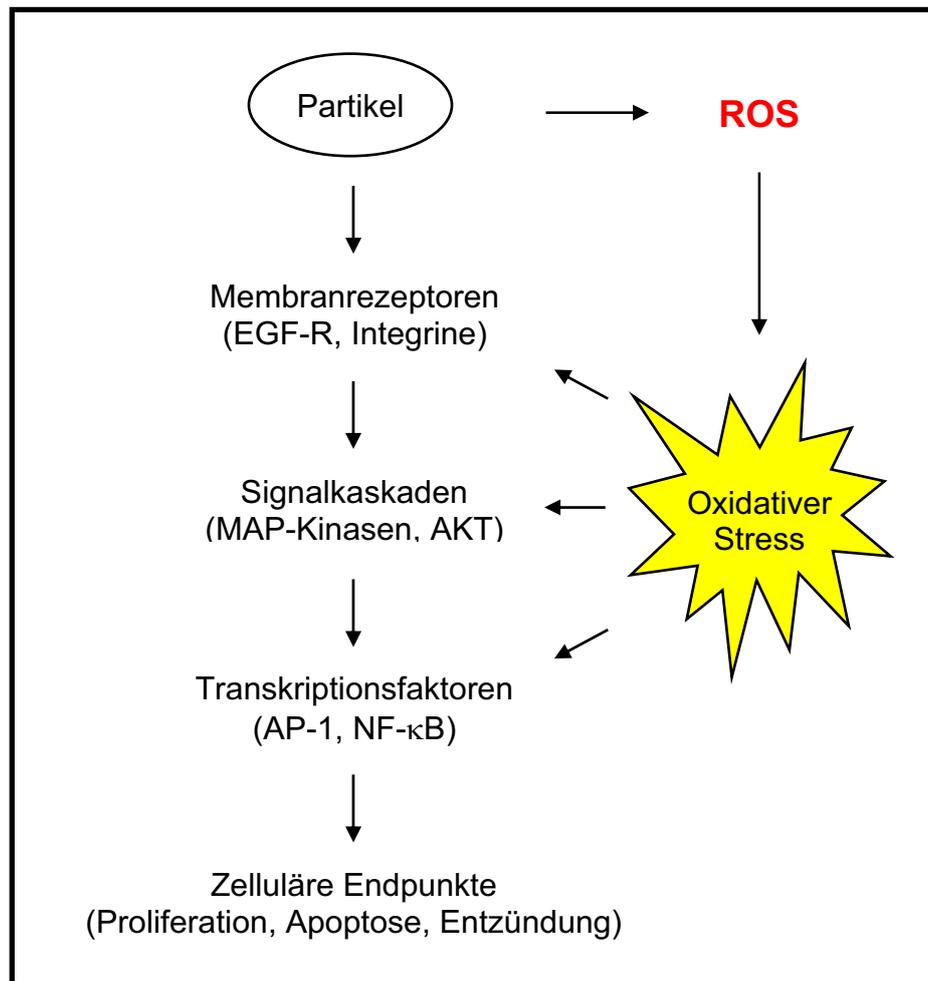
Inwieweit solch ein Zusammenspiel im Rahmen der partikelinduzierten Signaltransduktion in der Form stattfindet und relevant ist, muss noch eingehend geklärt werden. Untersuchungen mit UFP unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung haben Hinweise auf eine differentielle Wirkung der aktivierten MAP-Kinasen-Signalkaskaden geliefert. In kultivierten Lungenepithelzellen sind UFP

in der Lage, Proliferation und Apoptose parallel und unabhängig voneinander zu induzieren (Sydlik *et al.* 2006). Die ERK1/2-Aktivierung zeigt sich dabei als spezifisch für die Proliferation, während die Apoptose von der JNK1/2-Aktivierung bestimmt wird. Die Induktion beider Signalwege ist vom EGF-R abhängig. Die Entscheidung darüber, welcher der beiden Endpunkte auftritt, wird offenbar durch  $\beta$ 1-Integrin-vermittelte Signalkaskaden beeinflusst. Bei der Induktion der Proliferation, nicht aber der Apoptose, sind  $\beta$ 1-Integrine mitbestimmend.

Weitere *in vitro* Studien haben die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges durch ultrafeine Kohlenstoffpartikel in Lungenepithelzellen nachgewiesen (Unfried *et al.* 2008). Die Aktivierung ist sowohl vom EGF-R als auch von  $\beta$ 1-Integrinen abhängig, und hat eine direkte Wirkung auf die partikelinduzierte Proliferation. Diese wird durch eine AKT-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 vermittelt. Die gleichzeitige Aktivierung von AKT und ERK1/2, ihre Rezeptor-Abhängigkeit und ihr Einfluss auf die Proliferation legen die Existenz einer gemeinsamen Signalkaskade nahe.

#### **1.3.4 Modell zum molekularen Mechanismus UFP-induzierter Effekte**

Die bisherigen Erkenntnisse über die Toxizität von verbrennungsgenerierten UFP erlauben die zusammenfassende Aufstellung eines hypothetischen Modells der involvierten molekularen Mechanismen in Lungenepithelzellen (Abb. 1.2). Die Fähigkeit direkt oder indirekt ROS zu generieren, scheint eine Gemeinsamkeit aller Partikel zu sein (Donaldson *et al.* 2005). Infolgedessen entsteht oxidativer Stress, wodurch redoxempfindliche Signaltransduktionswege auf verschiedenen Ebenen – von Membran-Rezeptoren über Signalproteine bis zu Transkriptionsfaktoren – aktiviert werden können. Die Aktivierung lässt sich aber möglicherweise auch auf direkte Interaktionen der Partikel mit zellulären Strukturen, wie etwa der EZM und Integrinen, zurückführen (Albrecht *et al.* 2004, Unfried *et al.* 2007). Das Ergebnis ist die Induktion zellulärer Endpunkte, wie Apoptose und Proliferation, die das Potential zur Entwicklung negativer gesundheitlicher Effekte besitzen.



**Abb. 1.2** Hypothetisches Modell zum molekularen Mechanismus der UFP-Toxizität (verändert nach Albrecht *et al.* 2004).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Ultrafeines Carbon Black (ufCB), als Modell für den Partikelkern verbrennungsgenerierter UFP, induziert Proliferation und Apoptose in Lungenepithelzellen (Sydlik *et al.* 2006). Die EGF-R- und  $\beta$ 1-Integrin-abhängige Aktivierung von AKT und ERK1/2 ist am proliferativen Signaltransduktionsweg beteiligt (Unfried *et al.* 2008).

Neben dem Partikelkern beinhalten verbrennungsgenerierte Umweltpartikel weitere toxikologisch relevante Fraktionen: organische Stoffe und Übergangsmetalle. Mögliche modulatorische Effekte dieser Fraktionen auf die partikelinduzierte proliferative Signaltransduktion sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Insbesondere sollte die Rolle von partikelgenerierten ROS und dem dadurch induzierten oxidativen Stress in diesem Kontext analysiert werden.

Als *in vitro* Versuchssystem sollten eine Ratten-Lungenepithelzelllinie (RLE-6TN) (Driscoll *et al.* 1995) und ein kombinatorisches System von beschichteten und unbeschichteten Modell-Partikeln dienen. Dieses bestand aus ufCB (Partikelkern), Benzo[a]pyren (BaP, organische Fraktion) und Eisen-III-Sulfat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , Übergangsmetall-Salz) als Vertreter umweltrelevanter Stoffe. Damit sollten im Einzelnen folgende Fragen bearbeitet werden:

1. Haben BaP und/oder  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  einen Einfluss auf die partikelinduzierte Phosphorylierung von AKT und ERK1/2?
2. Sind Modell-Partikel in der Lage, extra- und intrazellulär ROS zu generieren? Welchen Einfluss haben diese jeweils auf die AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung?
3. Nehmen Modellpartikel und die dadurch generierten ROS Einfluss auf die spezifischen Rezeptor-abhängigen Signalwege über EGF-R und  $\beta$ 1-Integrine?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

##### Verwendete Geräte:

Autoklav, Tecnoclav	Integra Biosciences, Fernwald
Binokular, Leitz	Leica Microsystems, Wetzlar
Brutschrank für Zellkulturen (HERAcell 240)	Kendro, Hanau
ElektronenSpinResonanz (ESR) Spektroskop	Miniscope MS100, Magnettech, Berlin
FACScalibur Flow Cytometer	BD Bioscience Immunocytometry Systems, San Jose, USA
Gelkammern Dual gel vertical unit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Heizblock Bioblock Scientific	Thermolyne Corp., Dubuque, USA
Horizontal-Wasserbadschüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mehrkanalpipette 50-200 µl	Socorex, Ecublens, Schweiz
Mikroskop Leitz Laborlux K	Leica Microsystems, Wetzlar
Multipette® Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
pH-Meter, PHM 83 Autocal	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Photometer	
Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
MR 5000 Spektrophotometer	Dynatech, Embrach, Schweiz
Multiskan Ascent 96	Labsystems Inc., Waltham, USA
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments, Kelheim
Spannungsgeber	
EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, USA
GPS 200/400	Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, USA

Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sterilbank	W.H. Mahl, Kaarst
Western Blot Transferkammer	
Criterion™-Blotter	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ultraschallbad, Bransonic 220	Branson, Danbury, USA
Waagen	
Mettler PC 440, DeltaRange	Mettler-Toledo, Giessen
Sartorius 1602 MP	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen	
Eppendorf-Zentrifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Rotanta/RP	Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz
Sigma 3K30	B. Braun Biotech International, Melsungen
	Hettich, Tuttlingen
Mikro 200	

#### Verbrauchsmaterialien:

AcroCap™ Filter Unit	Pall, Ann Arbor, USA
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Falconröhrchen	BD Bioscience, Canaan, USA
Filterpapier	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Microcon YM-50	Millipore, Bedford, USA
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran	
Hybond®-P	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Röntgenfilme SuperRX	Fuji, Düsseldorf
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Geräte und Verbrauchsmaterialien werden an entsprechender Stelle im Methodenteil aufgeführt oder entsprechen dem üblichen Laborstandard.

### 2.1.2 Chemikalien

Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Desoxycholsäure-Natriumsalz (DOC)	Roth, Karlsruhe
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H <sub>2</sub> DCF-DA)	Calbiochem, Schwalbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Fluka, Buchs, Schweiz
5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxid (DMPO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dubelcco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fotochemikalien (GBX Entwickler und Fixierer)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hank's Buffered Saline Solution +Ca <sup>2+</sup> /+Mg <sup>2+</sup> (HBSS+/+)	GIBCO Invitrogen, Grand Island, USA
IGEPAL CA-630 (Nonidet-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	TSI, Zeven
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt

Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Nicotinamidadenindinukleotid ( $\beta$ -NADH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA Solution 10x	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid-Lösung 30% (v/v)	Merck, Darmstadt

Weitere an dieser Stelle nicht aufgeführte Chemikalien werden an entsprechender Stelle im Methodenteil beschrieben oder wurden von verschiedenen Herstellern in Analysequalität bezogen.

### 2.1.3 Inhibitoren

#### EGF-R-Inhibitoren:

- Compound 32 (4-[(3-Bromophenyl)amino]-6,7-dimethoxyquinazoline, Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach).
- Compound 56 (4-[(3-Bromophenyl)amino]-6,7-diethoxyquinazoline, Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach).

Beide Inhibitoren wurden als 10 mM Stocklösungen in DMSO angesetzt. Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M der jeweiligen Substanz und bei einer DMSO-Endkonzentration von 0,1% (v/v) für 1 h vorinkubiert.

Integrin-Inhibitoren:

- Monoklonaler Antikörper Hamster-Anti-Ratte CD29 (1-Integrin (No Azide/Low Endotoxin), Isotyp Hamster Immunglobulin M (IgM), BD BioSciences Pharmingen, San José, USA). Der Antikörper lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml Anti-CD29 für 1 h vorinkubiert.

Der monoklonale Antikörper Maus-Anti-Hamster IgM (BC BioSciences Pharmingen, San José, USA) diente als Negativkontrolle. Der Antikörper lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml Anti-Hamster IgM für 1 h vorinkubiert.

- RGDS-Peptid (H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH) (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach). Das RGD-Peptid wurde als 100 mM Stocklösung in A. dest angesetzt. Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 10 µM RGD für 1 h vorinkubiert.

Das Peptid GRADSP (H-Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-OH) (Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Das Kontrollpeptid wurde als 50 mM Stocklösung in 5 % (v/v) Essigsäure angesetzt. Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 10 µM Kontrollpeptid für 1 h vorinkubiert.

ROS-Inhibitoren:

- L-NAC (L-N-Acetyl-Cystein, Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach). Das NAC wurde als 500 mM Stocklösung in A. dest angesetzt (pH 7 – 8 mit 1 M NaOH eingestellt). Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 0,5 bzw. 5 mM für 18 h vorinkubiert, um das Glutathion-Reservoir der Zellen zu erhöhen.
- DPI (Diphenylenodonium-Chlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim). Das DPI wurde als 10 mM Stocklösung in DMSO angesetzt. Vor der Partikelbelastung wurden die

RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 0,2 bzw. 2  $\mu\text{M}$  und bei einer DMSO-Endkonzentration von 0,1% (v/v) für 1 h vorinkubiert.

- Katalase (aus Rinderleber, EC 1.11.1.6, Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach). Die Katalase wurde als 1.000.000 Units/ml Stocklösung in A. dest. angesetzt. Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 100 bzw. 1000 Units/ml für 1 h vorinkubiert.
- Cu/Zn SOD (Kupfer/Zink Superoxid Dismutase aus Rinderleber, EC 1.15.1.1, Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach). Die SOD wurde als 100.000 Units/ml Stocklösung in A. dest. angesetzt. Vor der Partikelbelastung wurden die RLE-6TN Zellen mit einer Endkonzentration von 100 bzw. 1000 Units/ml für 1 h vorinkubiert.

#### **2.1.4 Antikörper**

##### Primär-Antikörper:

Alle Antikörper wurden von Cell Signaling (Danvers, USA) bezogen.

- Kaninchen-Anti-AKT polyklonaler Antikörper
- Kaninchen-Anti-p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper

Eingesetzt wurden beide Antikörper 1:2000 in 5% Magermilchpulver/TBST verdünnt.

- Kaninchen-Anti-Phospho-AKT (Ser473) polyklonaler Antikörper
- Kaninchen-Anti-Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204) polyklonaler Antikörper

Eingesetzt wurden beide Antikörper 1:1000 in 5% BSA/TBST verdünnt.

### Sekundär-Antikörper:

- Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin G (IgG) Meerrettich-Peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich, Steinheim). Eingesetzt wurde der Antikörper entsprechend dem ersten Antikörper 1:2000 in 5% Magermilchpulver bzw. BSA/TBST verdünnt.

### **2.1.5 Modellpartikel-System**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ultrafeinen Kohlenstoffpartikel (unbeschichtetes und Benzo[a]pyren-beschichtetes Carbon Black) sowie das reine Benzo[a]pyren wurden im Rahmen anderer Studien bezogen bzw. hergestellt, aufgereinigt und charakterisiert (Mroz *et al.* 2008). Zwecks Zusammenarbeit innerhalb des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Sonderforschungsbereiches (SFB) 503 wurden die Partikel von Herrn Dr. R. P. F. Schins (Partikelforschung, Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

- Ultrafeines Carbon Black (ufCB): Bei diesen Partikeln handelt es sich um das Markenprodukt Printex<sup>®</sup> 90 der Firma Degussa (Frankfurt/Main), mit einem primären Durchmesser von 14 nm. Zur vollständigen Entfernung möglicher organischer Verunreinigungen waren die Partikel durch Soxhlet-Extraktion mit Toluol für 8 h gereinigt worden (Mroz *et al.* 2008).
- Ultrafeines Carbon Black beschichtet mit Benzo[a]pyren (ufCBBaP): Zur Beschichtung waren 2 g des gereinigten ufCB für 10 min in 120 ml n-Hexan suspendiert worden, welches 60 mg Benzo[a]pyren enthielt. Nach Vakuum-Filtrierung waren die beschichteten Partikel einmal in 10 ml Pentan gewaschen, und bis zum trockenen Zustand erneut Vakuum-filtriert worden. Der BaP-Gehalt der beschichteten Partikel war durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit Hilfe einer Grom-Säule und Fluoreszenz-Detektion ermittelt worden, und betrug 26 mg BaP pro Gramm ufCB (Mroz *et al.* 2008).

Die frisch eingewogenen Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad

mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert. Die Zellen wurden mit maximal 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Partikel belastet.

- Benzo[a]pyren (BaP): Das frisch eingewogene BaP wurde unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 3,5 mM Stocklösung in DMSO angesetzt, und analog zu den Partikeln beschallt. Die Zellen wurden mit einer maximalen Endkonzentration von 3,5  $\mu\text{M}$  belastet, was der errechneten BaP-Konzentration aus der Belastung mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CBBaP entspricht. Die DMSO-Endkonzentration betrug in jedem Fall 0,1% (v/v).
- Eisen-III-Sulfat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , FS): Das FS wurde aufgrund besserer Löslichkeit als Hydrat ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) mit einem durchschnittlichen Eisen-Gehalt von 20% von der Alfa Aesar (Karlsruhe) bezogen. Das frisch eingewogene FS wurde unmittelbar vor der Belastung der Zellen als 25 mM Stocklösung in PBS angesetzt, und analog zu den Partikeln beschallt. Die Zellen wurden mit einer maximalen Endkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  belastet. Bei der gemeinsamen Belastung mit ufCB bzw. ufCBBaP erfolgte eine getrennte Zugabe von Partikeln und FS.

### 2.1.6 Zelllinie

#### RLE-6TN:

Es handelt sich um eine SV-40-transfizierte, immortalisierte alveolare Typ II Lungenepithel-Zelllinie aus Ratte (ATCC, Manassas, USA; Driscoll *et al.*, 1995).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie RLE-6TN

RLE-6TN Zellen wurden als Monolayer-Kultur in RLE-6TN Nährmedium auf Plastik-Gewebekulturflaschen bei 37°C, 5% [v/v] CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel fand alle 2-3 Tage mit auf 37°C vorgewärmtem Medium statt.

Die Zellen wurden wöchentlich nach Erreichen 80-90%iger Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2x mit vorgewärmtem PBS gewaschen und mit einer dünnen Schicht Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt 3-5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Medium inaktiviert, die Zellen abgeschabt, resuspendiert und 6 min bei 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellen im Verhältnis 1:10 in eine Kulturflasche ausgesät.

#### RLE-6TN Nährmedium:

Nutrient Mixture F-12 Ham

2 mM L-Glutamin

5 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert

50 U/ml Penicillin

50 µg/ml Streptomycin

2,5 µg/ml Amphotericin B

#### 2.2.1.2 Belastung der Zellen

Sofern nicht an geeigneter Stelle besonders beschrieben wurden die Zellen in 6-Well-Plastikplatten (9,6 cm<sup>2</sup> pro Well) mit einer Dichte von 3x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und für ca. 20 h bis zu einer Konfluenz von 80 - 90% in 3 ml Nährmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für weitere 24 h in 3 ml serumreduziertem Medium gehalten. Bei

gleichzeitiger Verwendung verschiedener Inhibitoren wurden die Zellen für die entsprechende Zeit mit der jeweiligen Substanz bzw. mit der Lösungsmittelkontrolle vorbehandelt (vgl. 2.1.3). Anschließend erfolgte die Partikelzugabe (vgl. 2.1.5).

#### Serumreduziertes Medium:

Nutrient Mixture F-12 Ham

2 mM L-Glutamin

0,5 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert

50 U/ml Penicillin

50 µg/ml Streptomycin

2,5 µg/ml Amphotericin B

### **2.2.2 Zytotoxizitätsassay**

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der eingesetzten Konzentrationen an Partikeln wurde die Aktivität der zytosolischen Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Medium mit Hilfe des käuflichen Kits "CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay" (Promega, Madison, USA) fluorometrisch untersucht.

Die LDH ist ein in allen Säugetierzellen vorhandenes zytoplasmatisches Enzym. Es katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, die mit der Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  gekoppelt ist. Es ist ein essentieller Schritt im Energiestoffwechsel der Zelle, und wird nach dem Verlust der Membranintegrität aus dem Zytoplasma ins umgebende Medium freigesetzt (Rae, 1977). Die Höhe der LDH-Aktivität im Überstand ist somit ein Maß für die Zytotoxizität der Partikel. Im Assay wird die freigesetzte LDH durch Zugabe von Lactat,  $\text{NAD}^+$  und Resazurin in Anwesenheit von Diaphorase gemessen. Die Diaphorase katalysiert die Umsetzung von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin unter Verbrauch des durch die LDH-Reaktion gebildeten  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Die gemessene Fluoreszenz ist demnach proportional zur LDH-Menge.

Der Test wurde leicht verändert nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Medium der behandelten RLE-6TN Zellen abgenommen und auf Raumtemperatur temperiert. Für die Positiv-Kontrolle (maximale LDH-Konzentration)

wurden die Zellen vor Abnahme des Mediums mit 2 µl Lysepuffer pro 100 µl Medium lysiert. In einer 96-Well-Plastikplatte wurden 50 µl Medium vorgelegt und anschließend mit 50 µl CytoTox-ONE™-Reagenz versetzt. Die Proben wurden dann für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Reaktionsablauf wurde durch Zugabe von 25 µl Stopp-Lösung beendet. Die fluorometrische Detektion erfolgte dann mit Hilfe eines Fluorometers Fluoroskan Ascent (Labsystems). Für die Absorption und Emission wurde die Filterkombination 544/590 nm gewählt. Die ermittelte Fluoreszenzintensität diente zur Bestimmung der relativen Zytotoxizität in Bezug auf die maximale LDH-Konzentration.

## **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.3.1 Zellyse und Proteinextraktion**

Zur Herstellung von Proteinextrakten für Western-Blot-Analysen wurden die belasteten Zellen zunächst 2x mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Radionimmunopräzipitations (RIPA)-Puffer (70 µl für 9,6 cm<sup>2</sup>) durch Abschaben lysiert. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden die Lysate in Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Wieder aufgetaut, wurden die Lysate zur DNA-Scherung gevortext und 30 min bei 4°C mit 20.000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration auf Eis gehalten.

#### RIPA-Puffer:

25 mM Tris/HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

0,1 mM EDTA, pH 8,0

1% (w/v) Nonidet P-40 (Igepal CA-630)

1% (w/v) Desoxycholsäure-Natriumsalz

0,1% (w/v) SDS

0,025% (w/v) NaN<sub>3</sub>

1% (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, frisch zugesetzt

1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail, frisch zugesetzt.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Extrakten nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) wurde der DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Kurz beschrieben wurden in Mikrotiterplatten nacheinander 5 µl Proteinextrakt, 25 µl Lösung A' (20 µl Lösung S pro ml Lösung A) und 200 µl Lösung B pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 630 nm. Die Proteinkonzentration ließ sich anhand einer parallel aufgetragenen Eichkurve aus BSA in RIPA-Puffer errechnen.

#### DC Protein Assay Kit:

Lösung A: basische Kupfer-Tartrat-Lösung.

Lösung S: Inhalt vom Hersteller nicht angegeben; muss Lösung A zugegeben werden (20 µl/ml), wenn in den zu untersuchenden Proteinlösungen Detergenzien enthalten sind.

Lösung B: verdünntes Folin-Reagenz (Folin-Ciocalteus' Phenol-Reagenz).

### 2.2.3.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Laemmli *et al.*, 1970). Hierzu wurde in entsprechend zusammengesetzten Minigel-Glasplatten zunächst ein 1 mm dickes 10%iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol verworfen, ein 3%iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und der Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesetzt. Das fertige Gel wurde an eine vertikale Minigelkammer angebracht und diese mit Laufpuffer befüllt.

Die Proteinproben wurden mit 2x Elektrophorese-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen gegeben. Pro Geltasche wurden 5 µg Protein aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer konstanter Spannung von 50-75 V und nach Einlaufen der Lauffront in das Trenngel bei 100-120 V. Als Protein-

Größenstandard diente der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Trenngel:

10% (v/v) Rotiphorese Gel 30  
375 mM TrisHCl, pH 8,8  
0,1% (w/v) SDS  
0,05% (w/v) APS

Sammelgel:

3% (v/v) Rotiphorese Gel 30  
60 mM TrisHCl, pH 6,8  
0,1% (w/v) SDS  
0,05% (w/v) APS

Zum Starten der Polymerisationsreaktion wurden 15-20 µl TEMED zugegeben.

Laufpuffer:

50 mM Tris  
384 mM Glycin  
0,1% (w/v) SDS

Elektrophorese-Probenpuffer:

120 mM Tris/HCl, pH 6,8  
2% (w/v) SDS  
20% (w/v) Saccharose  
1% (v/v) β-Mercaptoethanol  
0,1% (w/v) Bromphenolblau

#### **2.2.3.4 Western Blot Transfer**

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine per Elektrotransfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF-)Membran übertragen. Zunächst wurde das Gel für 15 min in 4°C kaltem Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde nacheinander 10 s in Methanol, 5 min in A. dest und 10 min in 4°C kaltem Transferpuffer inkubiert.

Für den Transfer wurde der Bio-Rad Criterion™-Blotter nach Angaben des Herstellers verwendet. Kurz beschrieben wurden in der mitgelieferten aufklappbaren Transferkammer nacheinander aufgelegt: eine Lage Plastikwolle, eine Lage Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, eine Lage Filterpapier, eine Lage Plastikwolle. Die Transferkammer wurde zugeklappt und in den mit kaltem Transferpuffer gefüllten Tank derart eingesetzt, dass die Membran-Seite mit der Anoden-Platte

übereinstimmte. Der Transfer erfolgte für 1-1,5 h bei 50 V unter Rühren (Magnetrührer) und Kühlung (mitgeliefertes, wiederverwendbares Kühlelement).

#### Transferpuffer (pH 8,3):

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
10% (v/v) Methanol

### **2.2.3.5 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemilumineszenz**

Der Nachweis elektrophoretisch transferierter Proteine auf einer PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe verschiedener Antikörper in den entsprechenden Inkubationslösungen (vgl. 2.1.4).

Nach dem Western Blot Transfer wurde die PVDF-Membran zunächst für 5-10 min in TBST äquilibriert und dann zur Absättigung freier Protein-Bindungsstellen 1-2 h in Blockierungslösung bei RT unter Schütteln inkubiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation in der Primär-Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Danach wurde die Membran 4x 5 min mit TBST gewaschen und in der Sekundär-Antikörper-Lösung 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.

Mit dem ECL Plus™ Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) erfolgte die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper mittels Chemilumineszenz-Reaktion nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde die Membran erneut 4x 5 min mit TBST gewaschen, für 5 min mit ECL Plus Western blotting detection reagent inkubiert, und die Chemilumineszenz-Signale auf Röntgenfilm festgehalten.

#### TBST (Tris-gepufferte Saline mit Tween 20):

20 mM TrisHCl, pH 7,6  
137 mM NaCl  
0,1% (w/v) Tween 20

### Blockierungslösung:

Je nach primär Antikörper 5% (w/v) Magermilchpulver oder BSA in TBST (vgl. 2.1.4)

#### **2.2.3.6 Densitometrische Auswertung von Immunsignalen**

Die Quantifizierung der auf Röntgenfilmen festgehaltenen Signalstärke erfolgte durch densitometrische Auswertung mit Hilfe der frei zugänglichen Software ImageJ vom Nationalen Gesundheitsinstitut der USA (*US National Institute of Health*) (Abramoff *et al.* 2004; Rasband 1997-2008, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

#### **2.2.4 Messung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)**

##### **2.2.4.1 Messung der ROS-Generierung im zellfreien System mittels Fluorometrie**

Zur Bestimmung der partikelabhängigen ROS-Generierung im zellfreien Medium wurde die fluorogene Substanz 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) benutzt. Das H<sub>2</sub>DCF-DA wurde als 100 mM Stocklösung in DMSO angesetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Bildung des nicht-fluoreszierenden DCFH wurde 1 Volumen der Stocklösung mit 1 Volumen 1 M NaOH vermischt, und zum Ablauf der hydrolytischen Acetat-Abspaltung 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Endkonzentration von 20 µM DCFH, 0,1% DMSO in Serumarmem Medium (vgl. 2.2.1.2) verdünnt und damit auch neutralisiert.

In einer 96-Well-Plastikplatte (0,32 cm<sup>2</sup> pro Well) wurden je Well 10 µl der Partikelsuspension (vgl. 2.1.5) vorgelegt. Jeweils 100 µl der 20 µM DCFH-Lösung wurden dann hinzupipettiert. Die fluorometrische ROS-Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers Fluoroskan Ascent (Labsystems) bei 37°C. Für die Absorption und Emission wurde die Filterkombination 485/538 nm gewählt. Die ermittelte Fluoreszenzintensität diente zur Bestimmung der relativen ROS-Generierung.

#### 2.2.4.2 Messung der ROS-Generierung im zellfreien System durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie)

Die partikelabhängige Generierung von Hydroxyl-Radikalen wurde in einem zellfreien wässrigen Medium, und in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und DMPO nach Shi *et al.* (2003) durchgeführt. Vor dem erstmaligen Einsatz musste das DMPO zunächst aufgereinigt werden. Die gelieferte DMPO-Lösung (1 g) wurde in 1 ml Wasser (AAS-Qualität) aufgenommen, in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt und mit Wasser auf 7,5 ml aufgefüllt. Der Lösung wurden 30 mg/ml Aktivkohle zugefügt, und die entstandene Suspension 20 min bei 35°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 2250 g, RT) wurde der Überstand in ein neues Falcon-Reaktionsgefäß überführt, und die Aktivkohle-Reinigung wiederholt. Der daraus resultierende Überstand wurde dann filtriert (Filteraufsatz 0,2 µm Porengröße). Durch Messung der Absorption der 1:10.000 verdünnten Lösung bei 234 nm ( $A_{234\text{nm}}$ ) wurde die DMPO-Konzentration  $c$  anhand des molaren Extinktionskoeffizienten  $E$  ( $E_{234\text{nm}}(\text{DMPO}) = 77001 \text{ mol}^{-1}$ ) über die Lambert-Beerschen Gleichung ermittelt:

$$c = (A_{234\text{nm}}) / E.$$

Durch Wasserzugabe wurde die Lösung auf 1 M DMPO eingestellt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Messung von Hydroxyl-Radikalen wurden 50 µl der entsprechenden Partikelsuspension (vgl. 2.1.5) mit 50 µl Wasserstoffperoxid (0,5 M in PBS) und 100 µl DMPO (0,05 M in PBS) vermischt. Die Mischung wurde 15 min unter Schwenken bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Zur Entfernung der Partikel wurden die Suspensionen anschließend mit Hilfe von Microcones YM-50 durch Zentrifugation abfiltriert. Unmittelbar danach wurde das Filtrat mit einer 50-µl-Glaskapillare aufgenommen, und mit einem Miniscope MS100 ESR-Spektrometer gemessen.

Das ESR-Spektrum wurde bei RT und mit den folgenden Instrumenten-Einstellungen aufgenommen: Mikrowellenfrequenz 9,39 GHz, Magnetfeld 3360 G, sweep Bereichsbreite 100 G, Scanzeit 30 s, Anzahl der Scans 3, Modulationsamplitude 1,8 G, *receiver gain* 1000.

Zur Quantifizierung wurden die Amplitudenhöhen der vier Signale vom DMPO-OH-Quartett mittels der Instrumentensoftware ermittelt und miteinander addiert. Das Ergebnis, als *arbitrary units* (AU) ausgedrückt, diente als Parameter zur Bestimmung der relativen Radikalbildung.

### 2.2.4.3 Durchflusszytometrische Messung der ROS-Generierung mittels *Fluorescence activated cell sorter* (FACS)

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS wurden die Zellen (abgewandelt nach Bass *et al.* 1983) nach entsprechender Partikelbelastung zweimal mit 37°C warmen HBSS(+/-) gewaschen und anschließend mit einer frisch angesetzten 20 µM DCF-DA, 0,1% DMSO Lösung in warmen HBSS(+/-) beschichtet (vgl. 2.2.4.1). Nach einer 20 minütigen Inkubation im Dunklen wurden die Zellen einmal mit HBSS(+/-) gewaschen und dann für 3 – 5 min trypsiniert (vgl. 2.2.1.1). Die durch Klopfen abgelösten Zellen wurden in 1 ml kaltem HBSS(+/-) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (2 min, 1000 g, RT) wurden die pelletierten Zellen in 300 µl kaltem HBSS(+/-) resuspendiert und bis zur FACS-Messung auf Eis und im Dunkeln gehalten.

Die Erfassung und Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Instrumenten-Software BD Cell Quest 3.3. Aufgenommen wurden die FSC- und SSC-Intensität als Maß für die Größe und Granularität sowie die FL1-Intensität als Parameter für die DCF-Fluoreszenz, und damit für die intrazelluläre ROS-Generierung. Für jeden experimentellen Ansatz wurden 10.000 Zellen analysiert. Die aufgenommenen Daten wurden als *Dotplot* (korrelierte Darstellung zweier Parameter) oder als univariantes Histogramm, d. h. als Verteilung eines gemessenen Parameters, dargestellt.

Wenn FSC und SSC in einem *Dotplot* gegeneinander aufgetragen werden, erscheint am Schnittpunkt jedes gemessenen Signalpaars ein Punkt, der die entsprechende Zelle darstellt. In einem FSC-SSC-Plot wird folglich eine Punkten-Wolke abgebildet, die jeweils eine Zellpopulation ähnlicher Größe und Morphologie repräsentiert. Durch Regulierung der Detektor-Empfindlichkeit kann diese Population verschoben werden, um weitere Populationen (wie etwa morphologisch veränderte Zellen oder Zelltrümmer) sichtbar zu machen und zu identifizieren.

Zur Quantifizierung wurde die durchschnittliche FL1-Fluoreszenzintensität (FL1 *mean fluorescence*) ermittelt. Diese diente als Maß für die Bestimmung der relativen intrazellulären ROS-Generierung.

### **2.2.5 Statistik**

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal wiederholt, und ergaben reproduzierbare Ergebnisse. Diese werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Datenbewertung erfolgte über den Studentischen t-Test. Die Differenz von Werten mit  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant beurteilt (Zöfel 1992).

### **2.2.6 Abbildungen**

Die Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden zur besseren Darstellung digital bearbeitet jedoch ohne deren Inhalt zu verändern, welcher mit den Originaldaten identisch ist.

### 3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Signaltransduktionseffekten in Lungenepithelzellen, die durch ein Modell von verbrennungsgenerierten ultrafeinen Umweltpartikeln ausgelöst werden. Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Aktivierung von AKT und den MAP-Kinasen ERK1/2, als relevante Signaltransduktionswege der partikelinduzierten Proliferation. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf dem möglichen, gegenseitigen Einfluss der toxikologisch wichtigen Partikelbestandteile: Kohlenstoffkern, organische Fraktion und Übergangsmetalle. Weitere zentrale Aspekte der Analysen bildeten partikelgenerierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Beteiligung von Zelloberflächen-Rezeptoren an den molekularen Mechanismen der partikelinduzierten Signaltransduktion.

#### 3.1 Induktion der AKT- und ERK1/2-Aktivierung durch Modellpartikel

Zunächst wurde der Einfluss der Modellpartikel auf zelluläre Signaltransduktionswege anhand der induzierten Aktivierung der Signalproteinen AKT und ERK1/2 untersucht. Dabei dient die Phosphorylierung von AKT am Ser<sup>473</sup> und von ERK1/2 an Thr<sup>202</sup> und Tyr<sup>204</sup> jeweils als Maß für deren Aktivierung (Cobb & Goldsmith 1995; Kozikowski *et al.* 2003), welche immunologisch nachgewiesen werden kann.

#### Einfluss von BaP und FS auf die CB-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung

Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass ultrafeine CB-Partikel in RLE-6TN Zellen eine simultane AKT- und ERK1/2-Aktivierung zeit- und dosisabhängig induzieren können. Nach einer Behandlungsdauer von 8 h und bei einer Belastung mit 10 µg/cm<sup>2</sup> CB war diese Aktivierung maximal und signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Anhand des Modellpartikel-Systems wurden nach einer festgelegten Behandlungsdauer von 8 h mögliche durch die BaP-Beschichtung bzw. Anwesenheit von FS hervorgerufene Veränderungen in der relativen CB-abhängigen AKT- und ERK1/2-Aktivierung untersucht. Die Belastung der Zellen erfolgte mit 10 µg/cm<sup>2</sup> CB bzw. CBBaP, 3,5 µM BaP und in An- oder Abwesenheit von 15 µM FS.

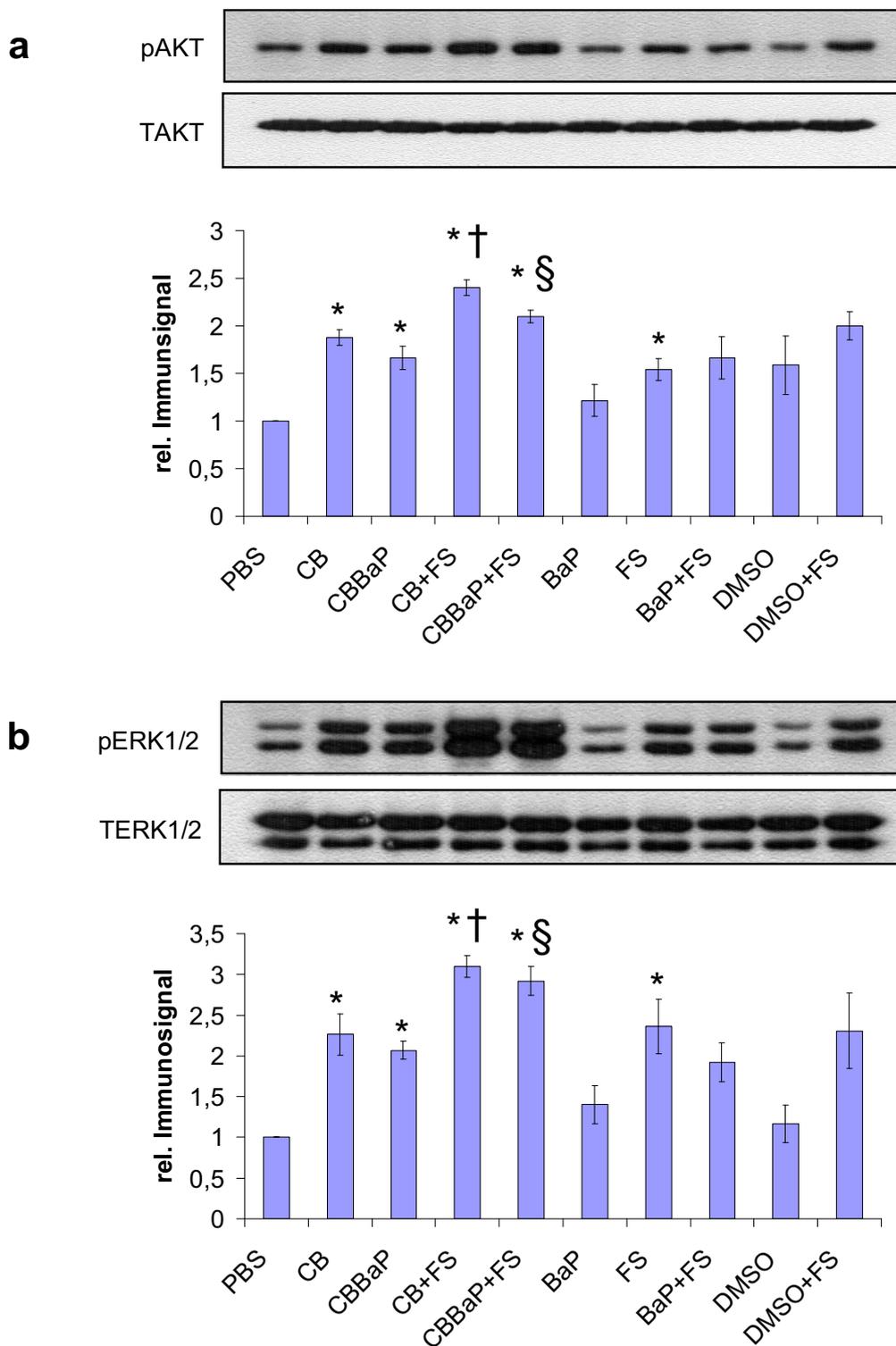
Die in Abb. 3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass reine CB-Partikel die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 um etwa das 1,9- bzw. 2,3-fache der entsprechenden Kontrollwerte (PBS) erhöhten. Die Behandlung mit BaP-beschichteten Partikeln führte zu einer vergleichbar starken Induktion der Phosphorylierung beider Proteine um jeweils das 1,7- und 2,1-fache. In dieser Hinsicht zeigte sich auf die partikelabhängigen Effekte kein Einfluss durch die BaP-Beschichtung.

Demgegenüber führte die Anwesenheit von FS in Kombination sowohl mit reinem als auch mit BaP-beschichtetem CB zu einer signifikanten Erhöhung der partikelinduzierten Phosphorylierung. Die AKT-Phosphorylierung wurde dabei um ca. 25%, die ERK1/2-Phosphorylierung um ca. 35% erhöht. FS alleine war ebenfalls in der Lage, die AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung um jeweils das 1,5- bzw. 2,3-fache zu erhöhen. Die FS-abhängigen Induktion der Phosphorylierung war somit mit der partikelabhängigen vergleichbar. Reines BaP zeigte keine Auswirkung auf die AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung, und hatte auch keinen Einfluss auf die FS-induzierten Effekte.

Der Nachweis der Gesamtproteine AKT (TAKT) und ERK1/2 (TERK1/2) zeigte keine durch das Modellpartikel-System verursachte Veränderung der Proteinmenge (Abb. 3.1), und kann deshalb fortan als Ladekontrolle betrachtet werden.

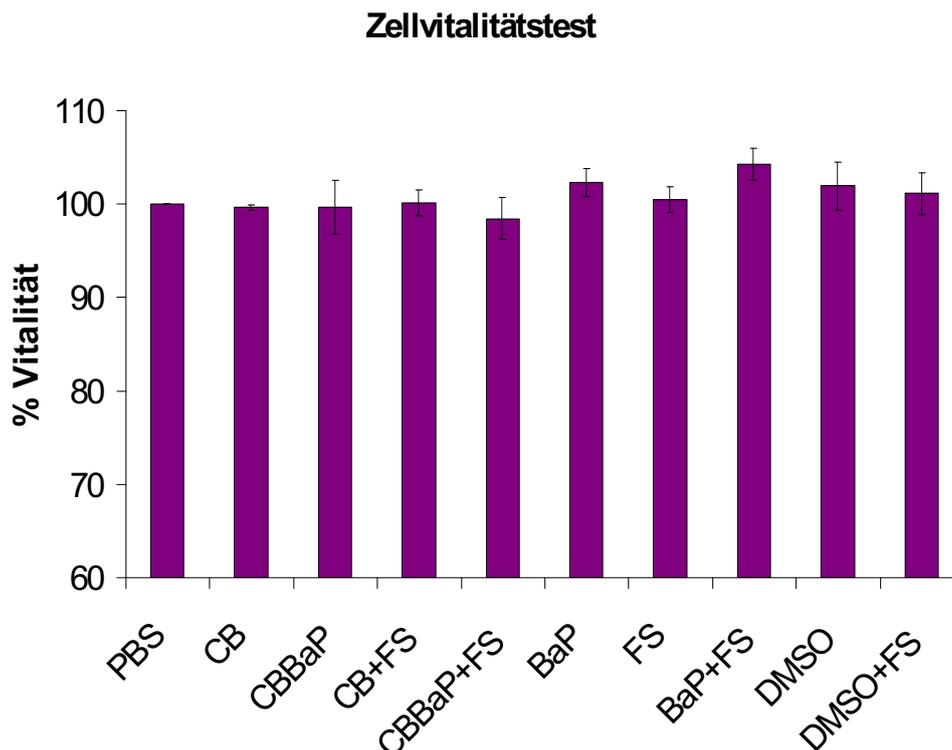
Die CB-induzierte Aktivierung der Signalproteine AKT und ERK1/2 lässt sich folglich durch FS modulieren, welches hier als Vertreter von umweltrelevanten Übergangsmetall-Salzen fungiert. FS wirkt dabei verstärkend, und ist in Abwesenheit der Partikel zugleich selbst in der Lage die Aktivierung zu induzieren. Dagegen hat die organische Fraktion in Form von BaP im Rahmen der betrachteten partikel-induzierten Signaltransduktion keinen Einfluss.

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Signaltransduktionseffekte nicht durch eine eventuelle zytotoxische Wirkung des eingesetzten Modellpartikel-Systems ausgelöst werden, wurde die Vitalität der Zellen überprüft. Hierzu diente die Bestimmung der relativen Menge an Laktat-Dehydrogenase (LDH), deren Freisetzung ins Kulturmedium ein Indikator für den Verlust der Zellmembranintegrität darstellt.



**Abb. 3.1 Einfluss von BaP und FS auf die CB-induzierte AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder CBBaP jeweils in Ab- und Anwesenheit von 15  $\mu\text{M}$  FS sowie mit 3,5  $\mu\text{M}$  BaP, 15  $\mu\text{M}$  FS oder 0,1% DMSO behandelt. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von (a) Phospho-AKT (pAKT) und (b) Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine AKT und ERK1/2 (TAKT und TERK1/2) diene als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zu CB; § signifikant unterschiedlich zu CBBaP ( $p < 0,05$ ).

Wie in Abb. 3.2 erkennbar, führte die 8-stündige Belastung der Zellen mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB bzw. CBBaP, 3,5  $\mu\text{M}$  BaP und in An- oder Abwesenheit von 15  $\mu\text{M}$  FS zu keiner signifikanten Veränderung in der Vitalität. Damit lässt sich ausschließen, dass die induzierte AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung auf behandlungsbedingte zytotoxische Effekte zurückzuführen ist.

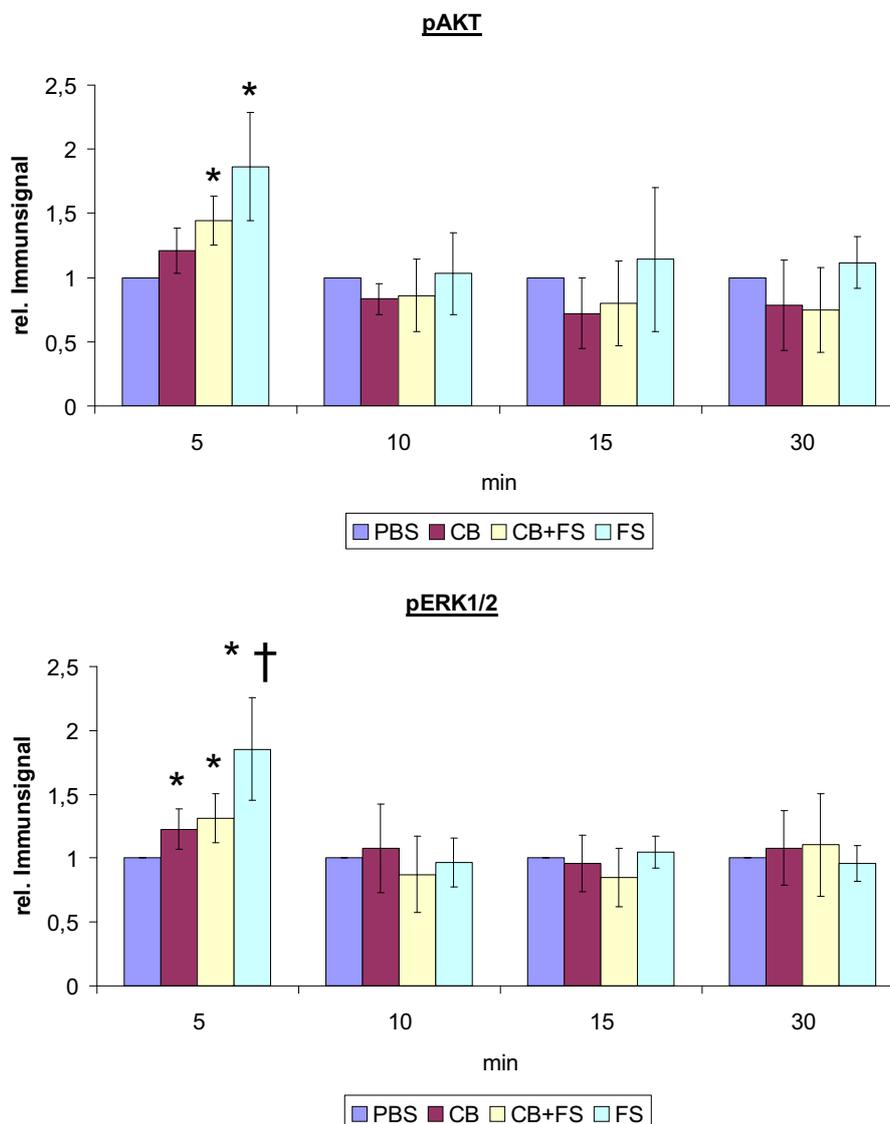


**Abb. 3.2 Zellvitalität nach Behandlung mit dem Modellpartikel-System:** RLE-6TN-Zellen wurden für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB oder CBBaP jeweils in Ab- und Anwesenheit von 15  $\mu\text{M}$  FS sowie mit 3,5  $\mu\text{M}$  BaP, 15  $\mu\text{M}$  FS oder 0,1% DMSO behandelt. Die LDH-Konzentration im Zellkulturmedium wurde fluorometrisch bestimmt, und die Zellvitalität anhand einer Positiv-Kontrolle (lysierte Zellen, 0% Vitalität) ermittelt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Zellvitalität relativ zur PBS-Kontrolle (100% Vitalität).

### 3.2 Unterschiede in den kinetischen Effekten im Vergleich mit CB

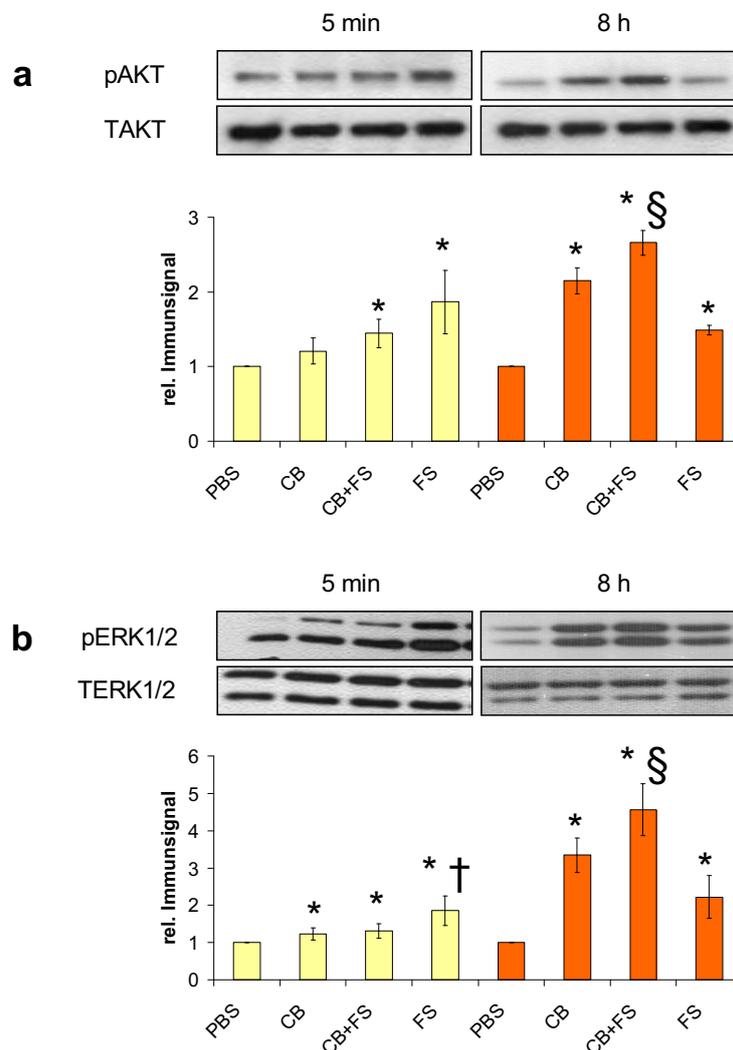
Die Verstärkung der CB-induzierte Signaltransduktionseffekte durch FS, und das Fehlen jeglichen Einflusses von BaP, gaben Anlass dazu, das Modellpartikel-System weiter einzugrenzen, und die weiterführende Untersuchungen auf die CB/FS-Kombination zu konzentrieren. In diesem Kontext wurden Analysen durchgeführt, die sich mit Signaltransduktionseffekten nach kurzzeitiger Behandlung der Zellen mit Partikeln befassten.

Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit der CB/FS-Partikelkombination erwies sich für eine minimale Belastungsdauer von 5 min als technisch verlässlich zu realisieren. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich ein Unterschied in der Kinetik der FS-induzierten Signaltransduktionseffekte, verglichen mit den CB-Partikeln und mit der Belastung nach 8 h. So induzierte FS (15  $\mu$ M) nach 5 min eine signifikante AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung um jeweils etwa das 1,8-fache der Kontrollwerte (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3 Zeitabhängige CB/FS-induzierte AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung im Kurzzeit-Bereich:** RLE-6TN-Zellen wurden für 5, 10, 15 und 30 min mit 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15  $\mu$ M FS behandelt. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von Phospho-AKT (pAKT) und Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zu CB+FS ( $p < 0,05$ ).

In Kombination mit CB ( $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) war die induzierte Phosphorylierung vermindert, und betrug das 1,4- (AKT) bzw. 1,3-fache (ERK1/2). Im Falle von ERK1/2 war hierbei der Unterschied zur FS-induzierten Phosphorylierung signifikant. CB alleine induzierte eine minimale Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 (jeweils das 1,2-fache), welche nur im letzteren Falle signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war. Der FS-Effekt klingt schnell wieder ab, und ist nach weiteren 5, 10 und 25 min nicht mehr vorhanden.



**Abb. 3.4 Gegenüberstellung der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Phosphorylierungsmuster nach 5 min und 8 h Behandlung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 5 min bzw. 8 h mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder  $15 \mu\text{M}$  FS behandelt. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von (a) Phospho-AKT (pAKT) und (b) Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die entsprechende PBS-Kontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine AKT und ERK1/2 (TAKT und TERK1/2) diene als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zu CB+FS; § signifikant unterschiedlich zu CB ( $p < 0,05$ ).

Die Belastung nach 8 h führt zum bereits beschriebenen FS-abhängigen, verstärkenden Effekt auf die CB-induzierte AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung, wie in Abb. 3.4 dargestellt. Diese zeigt den Vergleich der Phosphorylierungsmuster nach den genannten Zeitpunkten von 5 min und 8 h. Die Behandlung mit CB und/oder FS führt gleichermaßen zur Aktivierung von AKT und ERK1/2. Diese Signaltransduktionseffekte zeigen aber einen jeweils unterschiedlichen kinetischen Verlauf, der insbesondere im Kurzzeit-Bereich erkennbar wird. Der verstärkende FS-Effekt entwickelt sich später und ist nach 8 h deutlich zu beobachten.

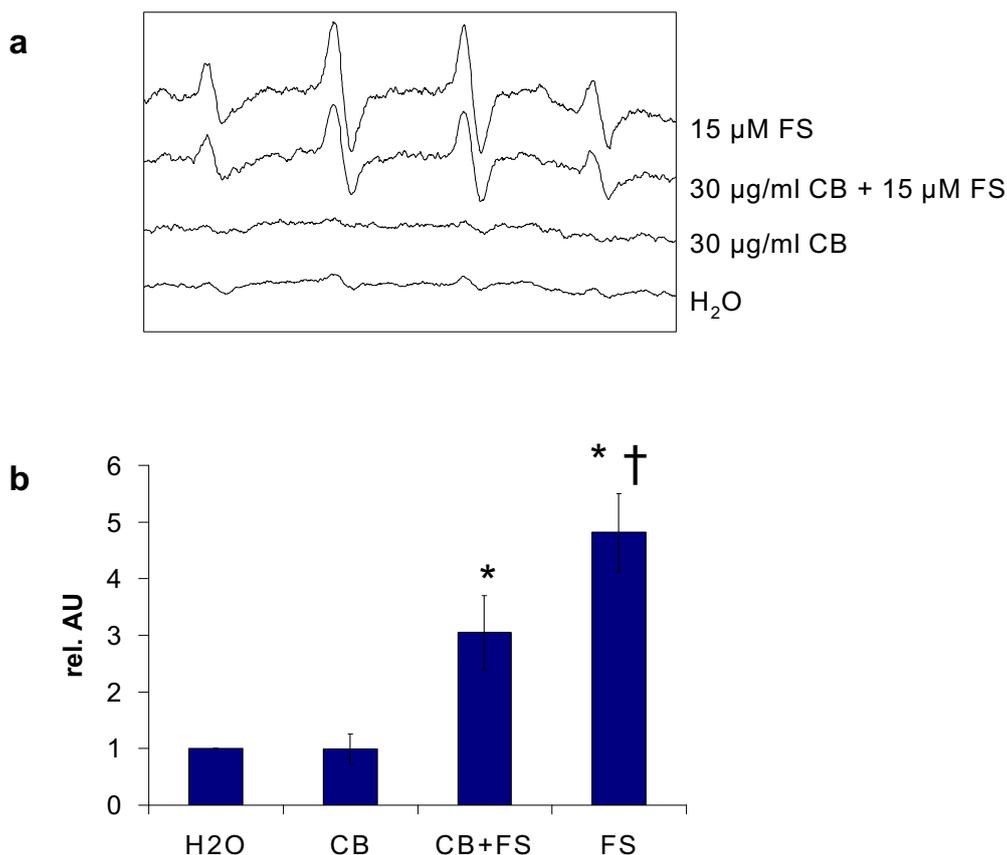
### 3.3 Nachweis CB/FS-abhängiger ROS in zellfreien Systemen und intrazellulär

Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie der damit verbundene oxidative Stress gelten gegenwärtig als gemeinsamer Ausgangspunkt und treibende Kraft der toxischen Effekte, die durch verbrennungsgenerierte ultrafeine Partikel hervorgerufen werden (Donaldson *et al.* 2005). Die Fähigkeit der CB/FS-Partikelkombination zur ROS-Generierung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf verschiedenen Wegen nachgewiesen. Das intrinsische oxidative Potential wurde zunächst in zellfreien Systemen untersucht. Die ESR-Spektroskopie diente zum Nachweis kurzlebiger Radikale (z. B.  $\cdot\text{OH}$ ) in wässrigem Medium mit Hilfe der Elektronen-Spin-Falle (*spintrap*) DMPO. Die Untersuchung allgemeiner ROS-Bildung, vorwiegend von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), erfolgte in Zellkulturmedium durch Messung der Fluoreszenzintensität des ROS-sensitiven Farbstoffes DCF.

Die intrazelluläre Bildung von ROS in Abhängigkeit der Partikelbehandlung wurde ebenfalls mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes nachgewiesen und durchflusszytometrisch untersucht.

Für die ESR-Untersuchungen wurden Suspensionen bzw. Lösungen mit den Endkonzentrationen 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CB, 15  $\mu\text{M}$  FS, 125 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 25 mM DMPO in PBS angesetzt. Die CB-Konzentration ergibt sich aus der Umrechnung der Partikelbelastung in Zellkultur-Versuchen (10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), bezogen auf das dort verwendete Volumen an Medium (3 ml). Nach 15 minütiger Inkubation der Suspensionen/Lösungen bei 37°C wurden diese zur Entfernung der Partikel filtriert, und das Filtrat wurde anschließend im ESR-Spektrometer gemessen. Die Filtrierung erwies sich als ein entscheidender Schritt, da Vorversuche hierzu eine partikelbedingte Interferenz mit der ESR-Messung gezeigt hatten.

Das aus Hydroxyl-Radikal und DMPO entstandene Addukt (DMPO-OH) zeigt ein charakteristisches ESR-Spektrum, das aus vier Signalen (Quartett) besteht. Abb. 3.5a zeigt ein typisches Ergebnis hierzu. Die Amplitude der Signale steht in direkter Korrelation mit der Addukt-Menge, und lässt somit auf die Bildung von Hydroxyl-Radikalen zurückschließen.



**Abb. 3.5 Nachweis der Bildung von Hydroxyl-Radikalen mittels ESR-Spektroskopie:** CB (30 µg/ml) und/oder FS (15µM) wurden für 15 min in Anwesenheit von 125 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 25 mM DMPO bei 37°C inkubiert. (a) Repräsentative Spektren des aus Hydroxyl-Radikal und DMPO entstandenen Adduktes DMPO-OH mit dem charakteristischen Signal-Quartett. (b) Mittelwert ± Standardabweichung der relativen durchschnittlichen Quartett-Amplitude der gemessenen Spektren in willkürlichen Einheiten (AU). \* signifikant unterschiedlich zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zu CB+FS (p < 0,05).

Abb. 3.5b zeigt die durchschnittliche Quartett-Amplitude der gemessenen CB/FS-Ansätze in Relation zur PBS-Kontrolle. Durch FS erfolgte eine signifikante 4,8-fache Induktion der Hydroxyl-Radikal-Bildung. Die Kombination von CB und FS führte ebenfalls zu einer Induktion, die jedoch das 3-fache des Kontrollwertes betrug, und somit um ca. 40% signifikant geringer als mit FS alleine ausfiel. Im Gegensatz dazu

führt CB zu keiner messbaren Hydroxyl-Radikal-Generierung im Vergleich mit der Kontrolle.

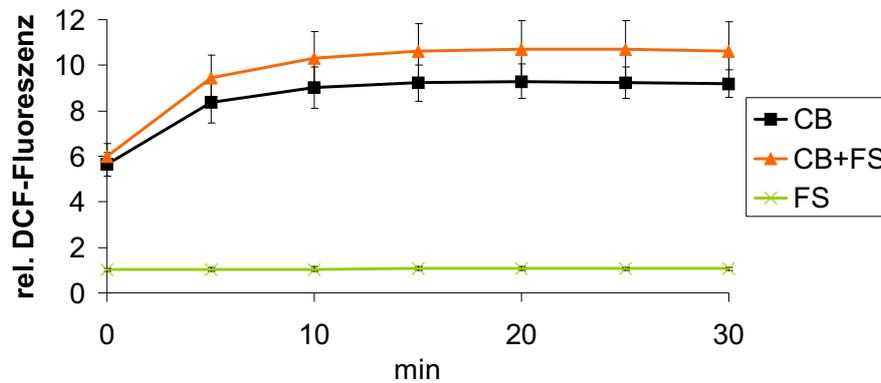
In einem wässrigen zellfreien Medium ist FS in der Lage, Hydroxyl-Radikale zu generieren. Interessanterweise führt die Anwesenheit von CB zu einer Verminderung der FS-induzierten  $\cdot\text{OH}$ -Generierung. Durch das reine CB wird dagegen keine Hydroxyl-Radikal-Bildung induziert.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des oxidativen Potentials von CB und FS in einem zellfreien Medium ist die fluorometrische Bestimmung eines ROS-empfindlichen Farbstoffes. Das 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) und Derivate davon werden in der fluorometrischen Bestimmung von ROS weit verbreitet eingesetzt. Nach enzymatischer oder chemischer Abspaltung der Acetat-Gruppen entsteht ein nicht-fluoreszierendes Produkt (DCFH), welches durch ROS (vorwiegend  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zum stark fluoreszierenden DCF oxidiert werden kann (Bass *et al.* 1983).

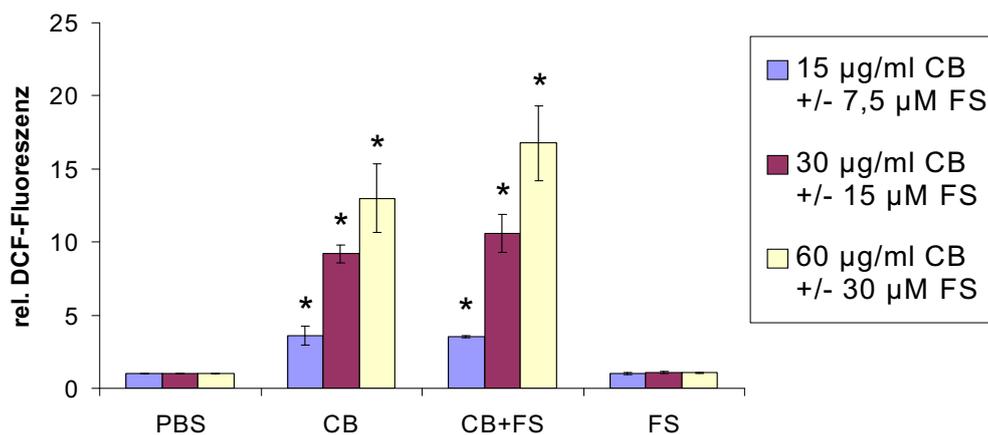
Der Nachweis CB/FS-abhängiger ROS erfolgte in serumreduziertem Zellkultur-Medium in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  DCFH, welches zuvor aus  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  durch alkalische Hydrolyse gewonnen wurde. CB/FS-Suspensionen wurden mit dem Medium versetzt, wobei die maximalen Endkonzentrationen jeweils 30  $\mu\text{g/ml}$  CB und 15  $\mu\text{M}$  FS betragen. Die gemessene Intensität der DCF-Fluoreszenz wurde als Parameter zur Ermittlung der relativen CB/FS-induzierten ROS-Generierung herangezogen.

Der Verlauf der CB/FS-abhängigen DCF-Fluoreszenz über 30 min, bei 30  $\mu\text{g/ml}$  CB bzw. 15  $\mu\text{M}$  FS, ist in Abb. 3.6a dargestellt. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde für jeden Zeitpunkt auf den entsprechenden Kontrollwert (PBS) normiert. CB-Partikel induzierten eine deutliche und sehr früh einsetzende DCF-Fluoreszenz, die innerhalb 15 min ein Maximum erreichte, und nachfolgend näherungsweise unverändert blieb. Nach 30 min betrug die relative DCF-Fluoreszenz das 9,2-fache der Kontrolle. In der Kombination von CB und FS ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität gegenüber CB um ca. 15% - jedoch nicht statistisch signifikant - erhöht. Dagegen zeigte FS alleine relativ zur Kontrolle keine Veränderungen der DCF-Fluoreszenz.

### a Zeitverlauf der partikelinduzierten ROS-Bildung in zellfreiem Medium



### b Dosisabhängigkeit der partikelinduzierten ROS-Bildung in zellfreiem Medium

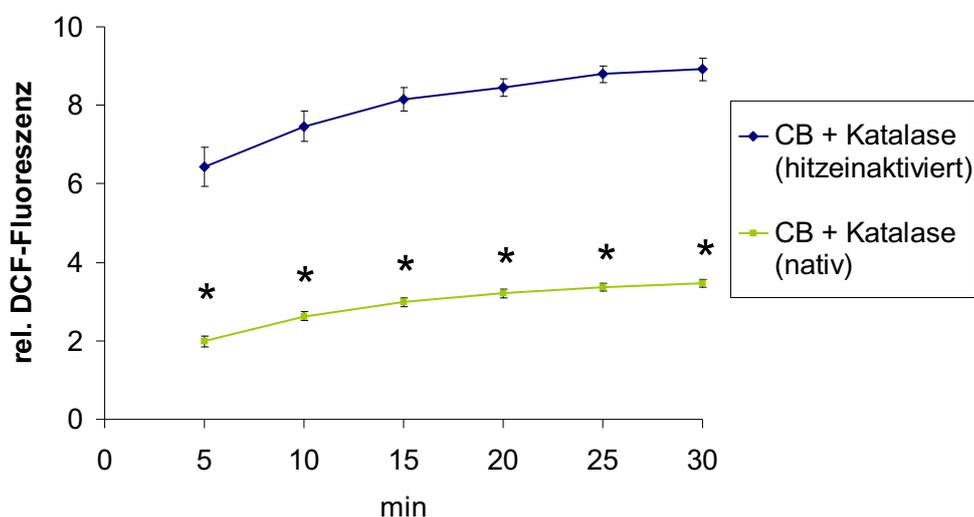


**Abb. 3.6 Nachweis der zeit- und dosisabhängigen ROS-Bildung mittels Fluorometrie:** (a) CB (30 µg/ml) und/oder FS (15 µM) wurden in Zellkultur-Medium in Anwesenheit von 20 µM DCFH (aus alkalischer Hydrolyse von H<sub>2</sub>DCF-DA) bei 37°C inkubiert. In Abständen von 5 min wurde die DCF-Fluoreszenz über 30 min gemessen, und diese für jeden Zeitpunkt in Relation zur Fluoreszenz der PBS-Kontrolle gesetzt. (b) 15, 30 und 60 µg/ml CB und/oder jeweils 7,5; 15 und 30 µM FS wurden in Zellkultur-Medium in Anwesenheit von 20 µM DCFH für 30 min bei 37°C inkubiert. Die ermittelte DCF-Fluoreszenz wurde in Relation zur Fluoreszenz der PBS-Kontrollen gesetzt. (a) und (b) zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung der relativen DCF-Fluoreszenzwerte. \* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (p < 0,05).

In Abb. 3.6b dargestellt ist die Dosisabhängigkeit der induzierten DCF-Fluoreszenz nach 30 min Inkubation mit 15, 30 und 60 µg/ml CB in An- und Abwesenheit von 7,5; 15 und 30 µM FS. Die reinen CB-Partikel zeigten entsprechend eine 3,6-, 9,2- und 13-fache Induktion der DCF-Fluoreszenz. In Kombination mit FS kam es bei den zwei höheren Konzentrationen zu einer Erhöhung der durchschnittlichen CB-

induzierten Fluoreszenz um jeweils ca. 15% und 30%, die jedoch beide statistisch nicht signifikant waren.

Durch gleichzeitige Inkubation der Versuchsansätze mit Katalase wurde überprüft, dass die hier gemessene DCF-Fluoreszenz durch die oxidative Wirkung hauptsächlich von  $H_2O_2$  zustande kam. Am Beispiel der CB-abhängiger ROS-Bildung wurden dazu CB-Suspensionen (30  $\mu\text{g/ml}$ ) in serumreduziertem Zellkultur-Medium in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  DCFH (durch alkalische Hydrolyse von  $H_2DCF\text{-DA}$  gewonnen) und 1000 U/ml Katalase, sowohl in der nativen Form als auch zuvor hitzeinaktiviert, inkubiert. Abb. 3.7 zeigt den Verlauf der CB-induzierten DCF-Fluoreszenz über 30 min. Für jeden Zeitpunkt wurde die gemessene Fluoreszenzintensität auf den entsprechenden Kontrollwert (PBS + hitzeinaktivierte Katalase bzw. PBS + Katalase) normiert. Der oben beschriebene asymptotische Verlauf der partikelabhängigen DCF-Fluoreszenz war zu allen Zeitpunkten durch die Anwesenheit der aktiven Katalase signifikant herabgesetzt. Nach 30 min war die ca. 9-fach induzierte Fluoreszenzintensität durch das  $H_2O_2$ -katalysierende Enzym um etwa 60% reduziert.



**Abb. 3.7 Inhibierung der CB-induzierten ROS-Bildung durch Katalase:** 30  $\mu\text{g/ml}$  CB wurden in Zellkultur-Medium in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  DCFH (aus alkalischer Hydrolyse von  $H_2DCF\text{-DA}$ ) und 1000 U/ml Katalase (nativ) oder der entsprechenden Menge an hitzeinaktivierter Katalase bei 37°C inkubiert. In Abständen von 5 min wurde die DCF-Fluoreszenz über 30 min gemessen, und diese für jeden Zeitpunkt in Relation zur Fluoreszenz der entsprechenden Kontrolle (PBS + native Katalase oder PBS + hitzeinaktivierte Katalase) gesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen DCF-Fluoreszenzwerte. \* signifikant unterschiedlich zu CB + hitzeinaktivierter Katalase ( $p < 0,05$ ).

CB-Partikel sind in der Lage, in serumreduziertem Zellkultur-Medium die Entstehung von ROS, und dabei in erster Linie  $H_2O_2$ , zu induzieren. Die weiteren Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von FS eine verstärkende Wirkung auf diesen Effekt hat. FS ohne CB-Partikel verursacht in diesem Versuchsansatz keine ROS-Generierung.

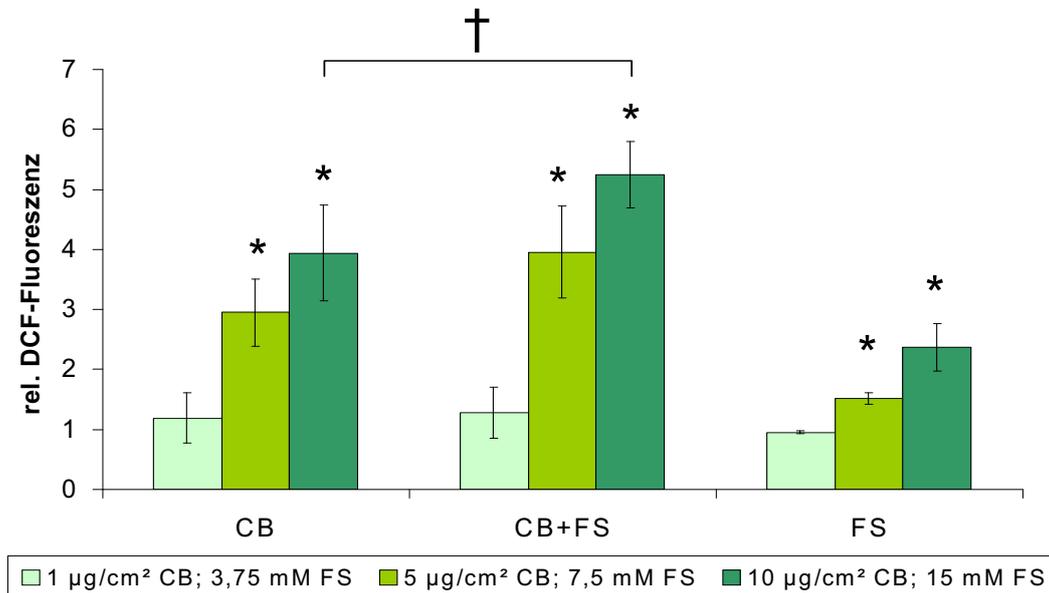
Insgesamt haben die bisherigen Untersuchungen gezeigt, dass CB und FS die Bildung von ROS in zellfreien Systemen induzieren können. Als nächster Schritt wurde daher untersucht, ob die Partikel in der Lage sind, auch eine intrazelluläre ROS-Generierung zu induzieren.

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Möglichkeit genutzt, intrazelluläre ROS in lebenden Zellpopulationen über die Messung der DCF-Fluoreszenz zu untersuchen (Bass *et al.* 1983). Das  $H_2DCF$ -DA ist lipophil und zellpermeabel. In der Zelle wird die Abspaltung der Acetat-Gruppen vom  $H_2DCF$ -DA zum ROS-sensitiven DCFH durch endogene Esterasen enzymatisch durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Messung der DCF-Fluoreszenz erfolgte nach einer Behandlungsdauer von 4 h mit maximal  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und  $15 \mu\text{M}$  FS. Hierzu wurden die behandelten Zellen durch Inkubation mit  $20 \mu\text{M}$   $H_2DCF$ -DA in HBSS(+/-) mit dem Farbstoff beladen, durch Trypsinierung abgelöst, und anschließend deren Fluoreszenz am FACS-Gerät gemessen. Die durchschnittliche DCF-Fluoreszenzintensität der gemessenen Zellpopulation (10.000 Zellen) diente als Maß für die intrazellulären ROS. Die erhaltenen Werte wurden auf lebende Zellen elektronisch gefiltert (*gated*), und anschließend auf den dadurch ermittelten Wert der PBS-behandelten Zellen (Kontrolle) normiert.

Die in Abb. 3.8 dargestellten Ergebnisse zeigen bei  $1, 5$  und  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB bzw.  $1,5; 7,5$  und  $15 \mu\text{M}$  FS eine dosisabhängige Zunahme der intrazellulären DCF-Fluoreszenz bei den drei Behandlungen CB, CB+FS und FS. Dabei kam es bei den beiden höheren Konzentrationen zu signifikant erhöhten Werten der detektierten Fluoreszenzintensität. Die CB-Behandlung führte bei  $5$  und  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einer ca. 3- bzw. 4-fachen Induktion der intrazellulären DCF-Fluoreszenz. FS-behandelte Zellen zeigten eine jeweils 1,5- und 2,4-fache Induktion bei  $7,5$  bzw.  $15 \mu\text{M}$ , somit fiel die FS-induzierte Fluoreszenz etwa 50% bzw. 40% niedriger aus, als durch die reinen Partikel. Mit der Kombination aus  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und  $7,5 \mu\text{M}$  FS wurde eine durchschnittlich ca. 4-fache Induktion der Fluoreszenz erreicht, die damit etwa 30% - jedoch nicht statistisch signifikant - höher lag als mit CB alleine. Die 5,2-fache

Induktion durch 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und 15  $\mu\text{M}$  FS lag ebenfalls 30% und signifikant höher als durch die entsprechende CB-Behandlung.



**Abb. 3.8 Durchflusszytometrischer Nachweis der intrazellulären ROS-Generierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 4 h mit 1, 5 und 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder jeweils 3,75; 7,5 und 15  $\mu\text{M}$  FS behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  in HBSS(+/+) beladen, trypsiniert und deren DCF-Fluoreszenz im FACS-Gerät gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der durchschnittlichen DCF-Fluoreszenz von jeweils 10000 lebenden Zellen in Relation zur PBS-Kontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zu CB ( $p < 0,05$ ).

CB-Partikel und FS induzieren somit dosisabhängig die intrazelluläre Bildung von ROS in RLE-6TN Zellen. Die Anwesenheit von FS bewirkt zudem eine Verstärkung der CB-induzierten ROS-Generierung.

### 3.4 Einfluss der CB/FS-abhängigen ROS auf die AKT- und ERK1/2-Aktivierung: Inhibierung der Signaltransduktionseffekte durch Katalase und SOD

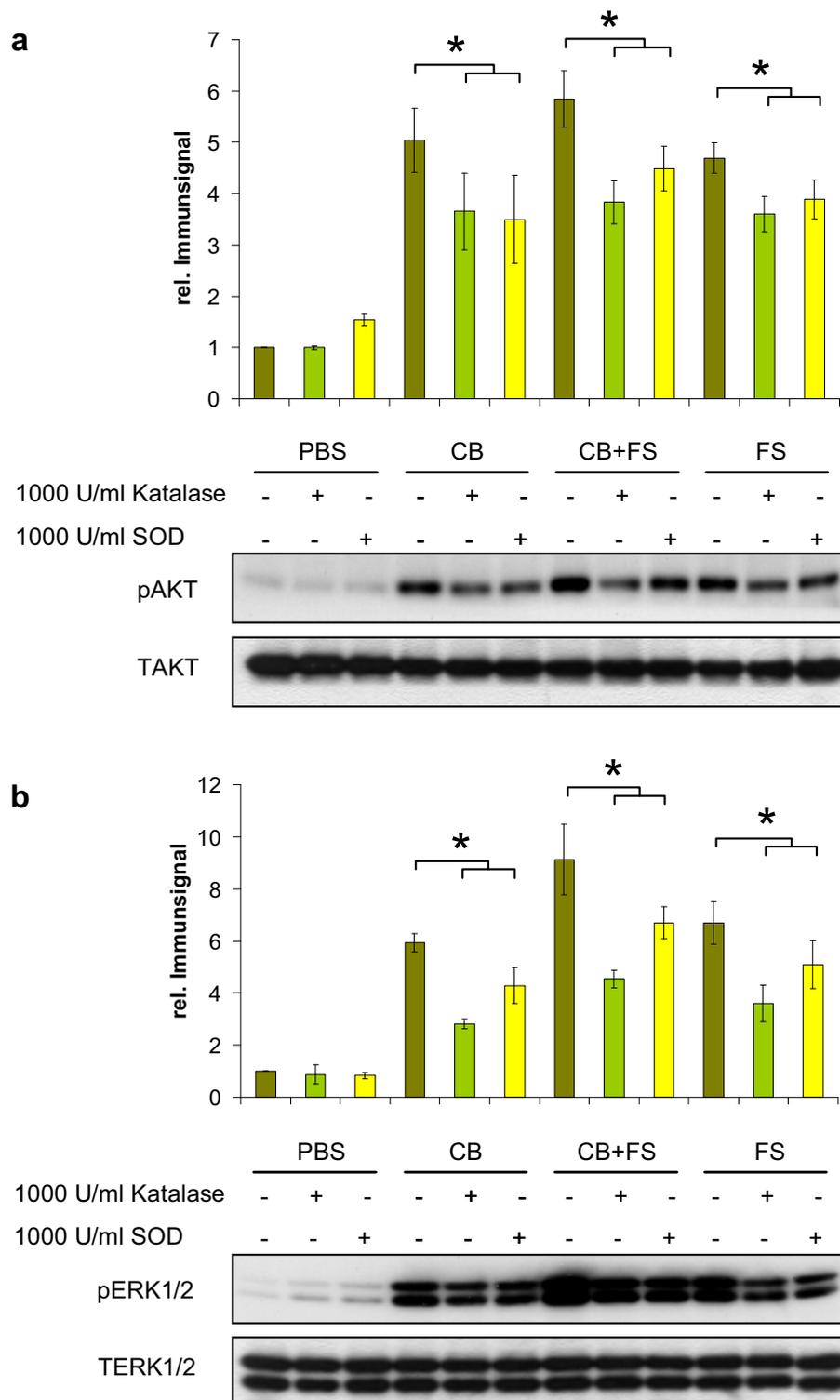
Die Induktion Redox-empfindlicher Signaltransduktionswege, die infolge von oxidativem Stress in Abhängigkeit von ultrafeinen Partikeln und ihren Bestandteilen auftritt, ist ein oft diskutiertes Ereignis im Kontext der Partikeltoxizität. Die Verbindung zwischen CB/FS-abhängigen ROS und den beobachteten Effekten auf die AKT- und ERK1/2-Aktivierung wurden daher hier untersucht. Durch Inhibitorstudien wurde diese Beziehung zunächst im Hinblick auf den Einfluss von extrazellulär generierten ROS.

Die Enzyme Katalase und Superoxid-Dismutase (SOD) bilden einen Teil des zellulären antioxidativen Systems (Seidman *et al.* 1999). SOD katalysiert die Reduktion von Superoxid-Radikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das von Katalase durch eine weitere Reduktion zu  $H_2O$  umgesetzt wird (Fridovich & Freeman 1986). Beide Enzyme passieren die Zellmembran nicht, wenn sie exogen zugegeben werden. Damit können sie zur ROS-Inhibierung im extrazellulären Raum eingesetzt werden.

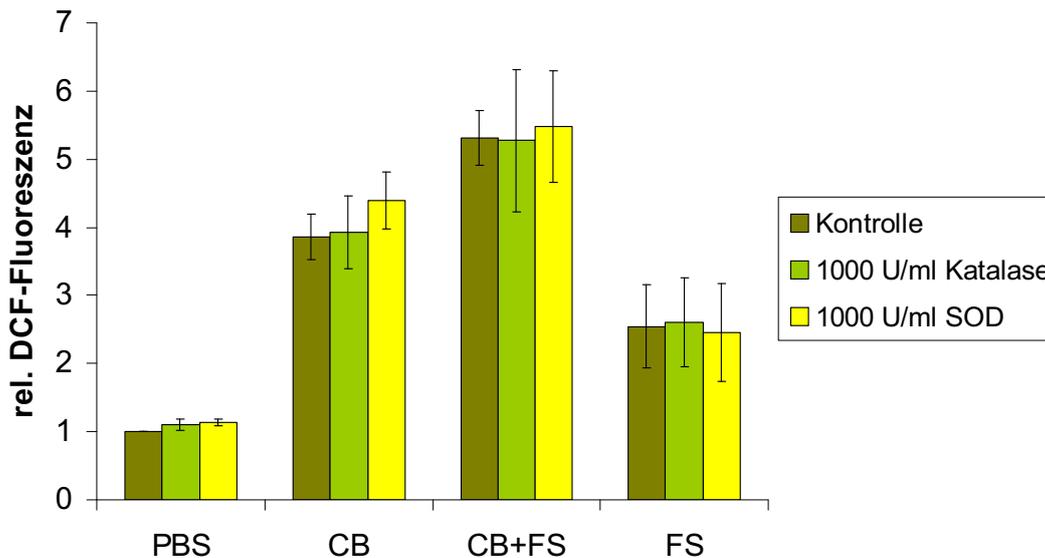
Zur Untersuchung der Auswirkung von CB/FS-abhängigen extrazellulären ROS wurden die Zellen vor der Partikelbehandlung mit jeweils 1000 U/ml Katalase oder SOD für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder  $15 \mu\text{M}$  FS für 8 h behandelt. Die Aktivierung von AKT und ERK1/2 wurde mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper in Western Blots immunologisch nachgewiesen.

Die Phosphorylierung der Signalproteine AKT und ERK1/2 und deren densitometrische Auswertung sind in Abb. 3.9 dargestellt. Die Behandlung mit Katalase führte zu einer signifikanten Inhibierung der induzierten AKT-Phosphorylierung um ca. 30% (CB und CB+FS) bzw. 20% (FS). Die Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung war dabei etwas stärker, zwischen 40% (FS) und 50% (CB und CB+FS). In Vorversuchen hierzu war festgestellt worden, dass eine Erhöhung der Katalase-Konzentration (bis zu 10.000 U/ml) keine stärkere Inhibierung herbeiführen konnte. Die Behandlung mit SOD führte zu ähnlichen inhibitorischen Effekten der AKT-Phosphorylierung, während die ERK1/2-Phosphorylierung um 20% (FS) bis 25% (CB und CB+FS) und damit weniger stark als mit Katalase reduziert wurde.

Um eine mögliche Verbindung zwischen der CB/FS-abhängigen extrazellulären ROS mit dem intrazellulären oxidativen Status festzustellen, wurden durchfluss-zytometrische Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen erneut mit jeweils 1000 U/ml Katalase bzw. SOD für 1 h vorinkubiert, und mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder  $15 \mu\text{M}$  FS für 4 h behandelt. Anschließend erfolgten die Beladung der Zellen mit dem fluorogenen Farbstoff  $H_2DCF\text{-DA}$  und die Fluoreszenz-Analysen am FACS-Gerät. Die Analysen zeigten, dass die exogen zugegebenen Enzyme keine Auswirkung auf die CB/FS-abhängige intrazelluläre ROS-Generierung hatten (Abb. 3.10).



**Abb. 3.9 Inhibierung der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung durch Katalase und SOD:** RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 1000 U/ml Katalase oder 1000 U/ml SOD vorbehandelt, und anschließend für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder 15  $\mu\text{M}$  FS belastet. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von (a) Phospho-AKT (pAKT) und (b) Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine AKT und ERK1/2 (TAKT und TERK1/2) diene als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zu nicht Katalase- oder SOD-vorbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.10 Einfluss von Katalase und SOD auf die CB/FS-induzierte intrazelluläre ROS-Generierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 1000 U/ml Katalase oder 1000 U/ml SOD vorbehandelt, und anschließend für 4 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder 15  $\mu\text{M}$  FS belastet. Danach wurden die Zellen mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  in HBSS(+/-) beladen, trypsinisiert und deren DCF-Fluoreszenz im FACS-Gerät gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der durchschnittlichen DCF-Fluoreszenz von jeweils 10000 lebenden Zellen in Relation zur PBS-Kontrolle.

Die Inhibierung von extrazellulär gebildeten ROS durch die Enzyme Katalase und SOD führt zu einer signifikanten Verminderung, jedoch nicht vollständigen Hemmung der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung. Des Weiteren haben extrazellulär gebildete ROS keinen Einfluss auf die induzierte intrazelluläre ROS-Generierung. Somit sind sie an der partikelabhängigen Signaltransduktion beteiligt, ohne dabei zum partikelinduzierten oxidativen Status der Zelle beizutragen.

### 3.5 Inhibierung der Signaltransduktionseffekte durch NAC und DPI

Nachdem die Beteiligung von extrazellulären ROS an den partikelinduzierten Signaltransduktionseffekten gezeigt wurde, wurde anschließend der Einfluss von intrazellulär gebildeten ROS durch weitere Inhibitorstudien untersucht.

Das Tripeptid Glutathion (GSH) spielt eine wichtige Rolle im antioxidativen Schutz der Zelle. Glutathion wirkt als ROS-Inhibitor, indem es mit Peroxiden (z. B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reagiert. Die Reaktion wird von der Glutathion-Peroxidase katalysiert und führt zur Bildung von oxidiertem Glutathion (GSSG) und  $\text{H}_2\text{O}$ . Die GSH-Synthese kann durch

Zugabe von N-Acetyl-cystein (NAC) angeregt werden, wobei das NAC selbst auch als Radikalfänger fungieren kann (Sadowska *et al.* 2007).

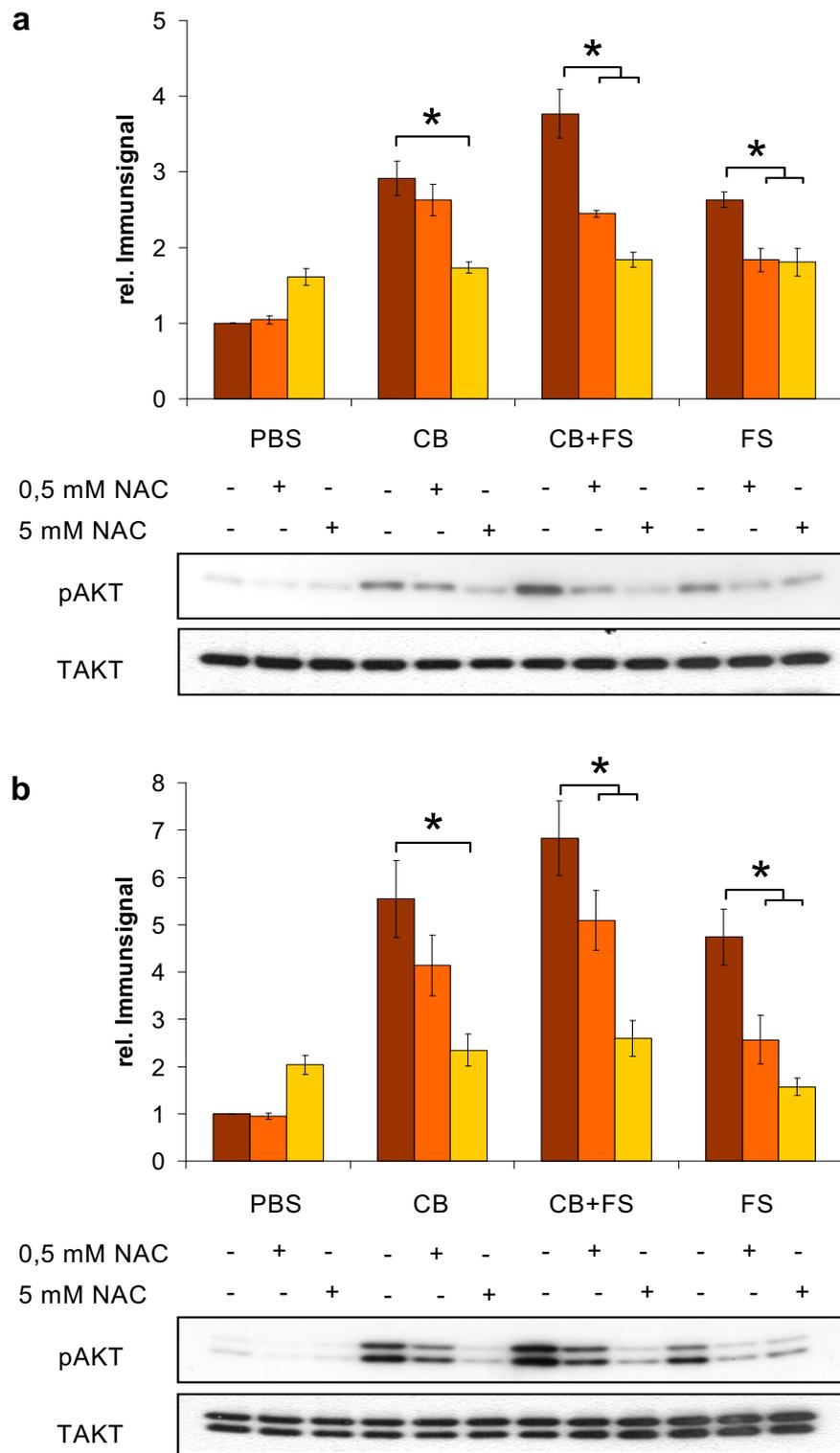
Bei den NADPH-Oxidasen handelt es sich um eine Familie membrangebundener Enzyme, die bei der intrazellulärer ROS-Entstehung sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle spielen (Lambeth 2007). Die Aktivität der NADPH-Oxidasen, und damit indirekt die ROS-Bildung, lässt sich mit dem pharmakologischen Inhibitor Diphenyleniodonium (DPI) hemmen (Stuehr *et al.* 1991).

Zum Nachweis der Beteiligung von intrazellulären ROS an der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2- Aktivierung wurden die Zellen zunächst mit 0,5 und 5 mM NAC für 18 h bzw. 0,2 und 2  $\mu$ M DPI für 1 h vorinkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15  $\mu$ M FS für 8 h behandelt. Die Aktivierung von AKT und ERK1/2 wurde mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper in Western Blots immunologisch nachgewiesen.

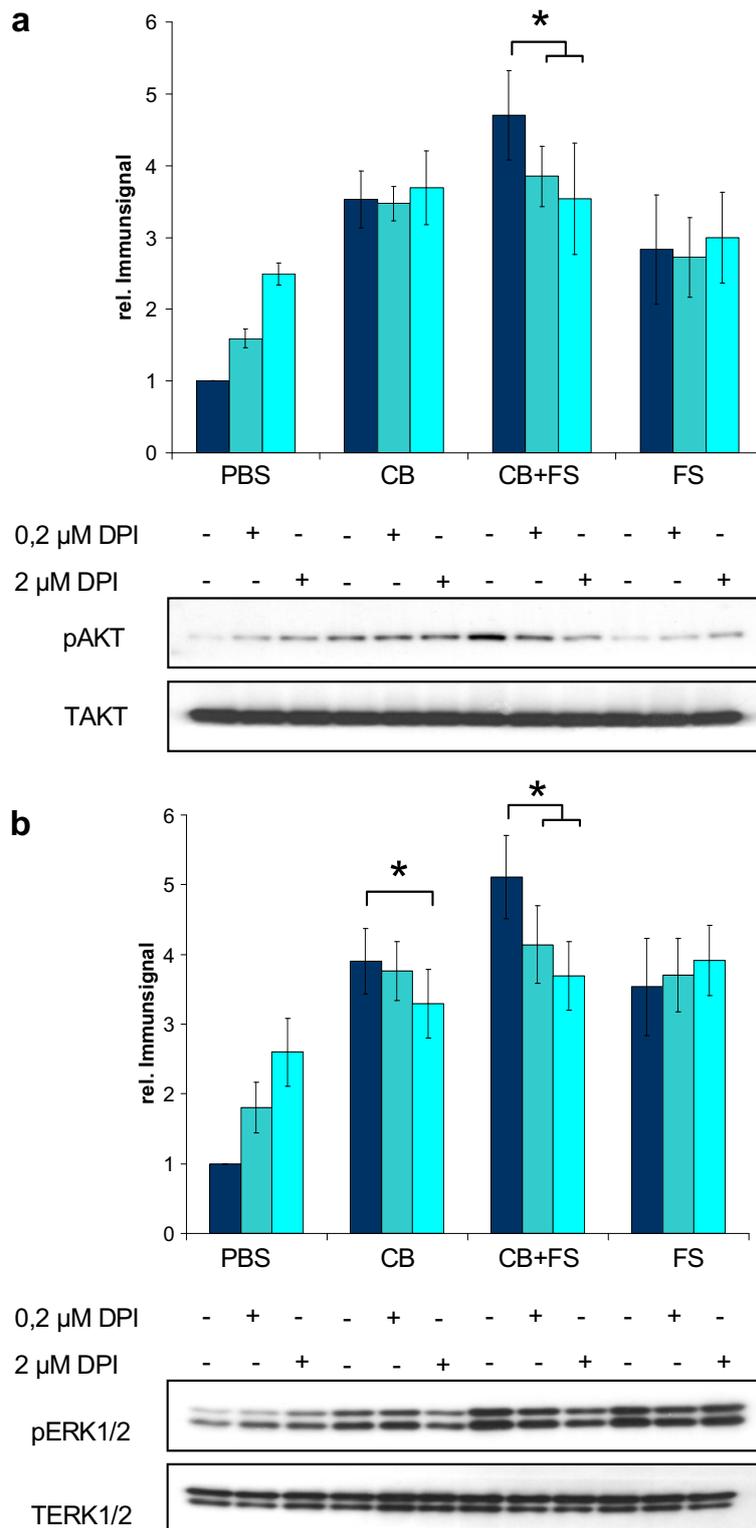
Die densitometrische Auswertung der Immunsignale für NAC (Abb. 3.11) zeigt in den CB- und CB+FS-behandelten Zellen eine signifikante dosisabhängige Abnahme der AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung. Diese betrug bei 0,5 mM NAC etwa 40%, während bei 5 mM NAC die Phosphorylierung auf Kontroll-Niveau gebracht wurde. Die praktisch vollständige Hemmung der induzierten AKT- und Erk1/2-Phosphorylierung trat in den FS-behandelten Zellen bereits bei 0,5 mM NAC ein.

Die Behandlung mit DPI führte auf dem ersten Blick zu weniger eindeutigen inhibitorischen Effekten (Abb. 3.12). Die densitometrisch ausgewerteten Immunsignale deuten bei den CB-behandelten Zellen auf eine leicht dosisabhängige Inhibierung der AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung hin. Bei 2  $\mu$ M DPI ergab sich eine signifikante Abnahme um etwa 15%. In den CB+FS-behandelten Zellen war die Abnahme der induzierten Phosphorylierung deutlicher zu erkennen. Diese betrug ca. 20% bei 0,2  $\mu$ M DPI bzw. 30% bei 2  $\mu$ M DPI. In den FS-behandelten Zellen zeigte sich keine signifikante Auswirkung durch DPI.

Interessanterweise ist das DPI selbst in der Lage, die AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung zu induzieren, wie in derselben Abbildung zu erkennen ist. Es ist möglich, dass hier zwei Mechanismen mit gegenläufigem Effekt ablaufen. Einerseits die Inhibierung von NADPH-Oxidasen, die zu einer verminderten ROS-Produktion führt. Andererseits eine auf noch ungeklärtem Weg induzierte Signaltransduktion.



**Abb. 3.11 Inhibierung der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung durch NAC:** RLE-6TN-Zellen wurden für 18 h mit 0,5 oder 5 mM NAC vorbehandelt, und anschließend für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder 15  $\mu\text{M}$  FS belastet. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von (a) Phospho-AKT (pAKT) und (b) Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine AKT und ERK1/2 (TAKT und TERK1/2) diene als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zu nicht NAC-vorbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ).

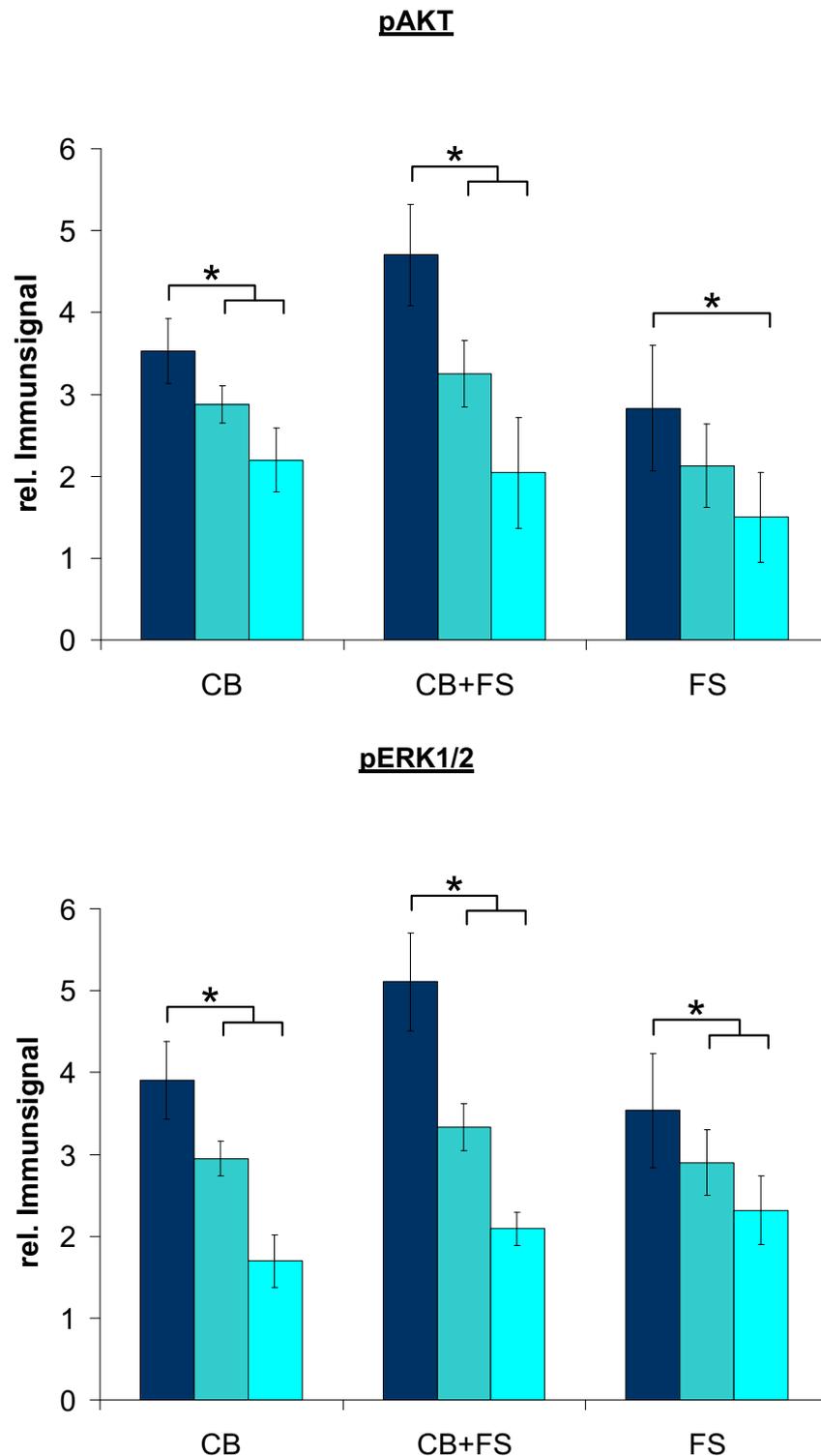


**Abb. 3.12 Inhibition der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung durch DPI:** RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 0,2 oder 2 μM DPI vorbehandelt, und anschließend für 8 h mit 10 μg/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15 μM FS belastet. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von (a) Phospho-AKT (pAKT) und (b) Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine AKT und ERK1/2 (TAKT und TERK1/2) diente als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zu nicht DPI-vorbehandelten Zellen (p < 0,05).

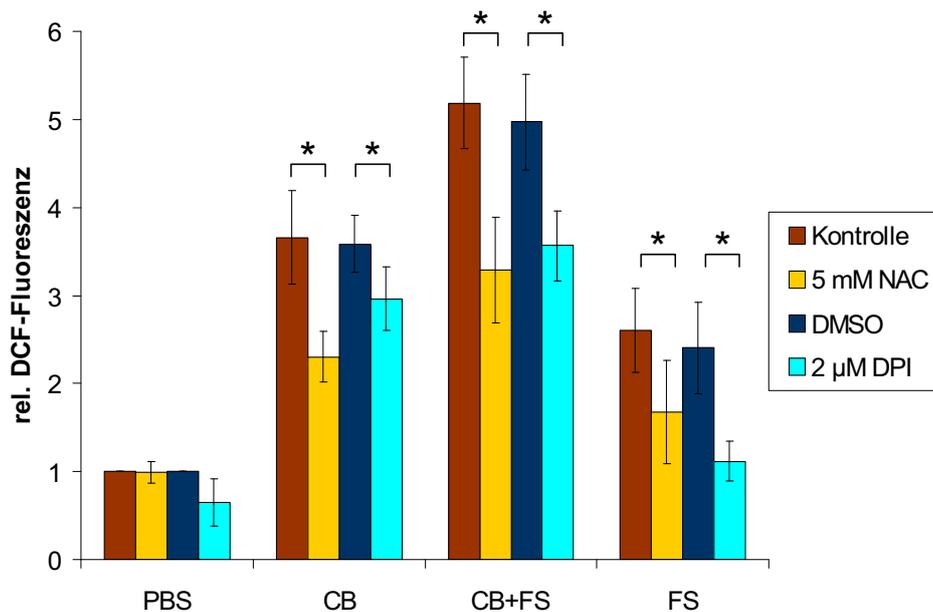
Mit dem Zweck, auf den inhibitorischen Effekt hinzudeuten, erscheint eine auf den induzierenden Effekt korrigierte Darstellung als zulässig (Abb. 3.13). Dazu wurde zunächst die Differenz zwischen den densitometrisch erhaltenen Werten für die PBS- und die 0,2 bzw. 2  $\mu\text{M}$  DPI-behandelten Zellen ermittelt. Dieser Wert wurde dann von dem der entsprechend CB/FS-behandelten Zellen abgezogen. Anschließend wurden die Werte auf die PBS-Kontrolle normiert.

Durch diese Korrektur wird eine signifikante dosisabhängige Abnahme der AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung durch DPI erkennbar (Abb. 3.14). Bei 0,2  $\mu\text{M}$  DPI ist die AKT-Phosphorylierung um 20% (CB und CB+FS) bzw. 25% (FS) reduziert. Bei 2  $\mu\text{M}$  DPI ist die Inhibierung mit jeweils 40% (CB), 60% (CB+FS) und 50% (FS) deutlich stärker. Analog dazu ist die ERK1/2-Phosphorylierung bei 0,2  $\mu\text{M}$  DPI um jeweils 25% (CB), 35% (CB+FS) und 20% (FS) reduziert. Eine stärkere Abnahme um jeweils 60% (CB und CB+FS) und 35% (FS) ergibt sich bei 2  $\mu\text{M}$  DPI. Die Verbindung zwischen intrazellulären ROS und der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung wurde hinsichtlich der Wirkung der Inhibitoren auf den oxidativen Status durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 5 mM NAC für 18 h bzw. 2  $\mu\text{M}$  DPI und 0,1% DMSO (Lösungsmittelkontrolle) für 1 h vorinkubiert, und mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder 15  $\mu\text{M}$  FS für 4 h behandelt. Anschließend erfolgten die Beladung der Zellen mit dem fluorogenen Farbstoff  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  und die Fluoreszenz-Analysen am FACS-Gerät.

Die Analysen zeigen eine ca. 40%ige Abnahme der DCF-Fluoreszenzintensität durch NAC relativ zur entsprechenden Partikelbehandlung (Abb. 3.14). DMSO als Lösungsmittelkontrolle für DPI führte zu keiner Veränderung. Darauf bezogen betrug die DPI-abhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität 15% bei CB und 30% bei CB+FS. Die FS-induzierte Fluoreszenz blieb durch das DPI auf Kontroll-Niveau. Die Ergebnisse stehen mit den Western-Blot-Analysen insofern im Einklang, als dass eine Inhibierung von intrazellulären ROS zu einer Abnahme der CB/FS-anhängigen AKT- und ERK1/2-Aktivierung führt.



**Abb. 3.13 Korrigierte Darstellung der Inhibition der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung durch DPI:** Die Differenz zwischen der Immunsignalintensität nach Behandlung mit 0,2 bzw. 2  $\mu\text{M}$  DPI und der Signalintensität der PBS-Kontrollen von Phospho-AKT (pAKT) und Phospho-ERK1/2 wurde vorab ermittelt, und von den Signalintensitätswerten der entsprechend DPI-vorbehandelten und CB/FS-belasteten Zellen abgezogen. Die densitometrische Auswertung zeigt den anschließend gebildeten Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität in Bezug auf die PBS-Kontrolle. \* signifikant unterschiedlich zu nicht DPI-vorbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.14 Einfluss von NAC und DPI auf die CB/FS-induzierte intrazelluläre ROS-Generierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 18 h mit 5 mM NAC oder für 1 h mit 2 µM DPI bzw. 0,1% DMSO vorbehandelt, und anschließend für 4 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15 µM FS belastet. Danach wurden die Zellen mit 20 µM H<sub>2</sub>DCF-DA in HBSS(+/+) beladen, trypsiniert und deren DCF-Fluoreszenz im FACS-Gerät gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung der durchschnittlichen DCF-Fluoreszenz von jeweils 10000 lebenden Zellen in Relation zur PBS- bzw. DMSO-Kontrolle. \* signifikant unterschiedlich zu nicht NAC- oder DPI-behandelten Zellen (p < 0,05).

Die erhaltenen Daten zeigen, dass die CB/FS-induzierte Aktivierung von AKT- und ERK1/2 in Verbindung mit einer gesteigerten ROS-Generierung innerhalb der Zelle steht. Es gibt zudem Hinweise auf eine Beteiligung von NADPH-Oxidasen an der partikelabhängigen ROS-Bildung und Signaltransduktion.

### 3.6 Bedeutung von Zelloberflächen-Rezeptoren für die CB/FS-induzierte Signaltransduktion

Zelloberflächen-Rezeptoren bilden mögliche Ziele der Partikel-Zell-Interaktion sowie Angriffspunkte für ROS. Zwei der möglichen Ziel-Moleküle sind der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGF-R) und Integrine (Unfried *et al.* 2008). Deren Beteiligung an den CB- und FS-induzierten Signaltransduktionseffekten wurde deshalb unter Einsatz von spezifischen Inhibitoren der EGF-R- bzw. Integrin-vermittelte Signaltransduktion untersucht.

Compound 32 und Compound 56 gehören zu den stärksten pharmakologischen Inhibitoren der Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors. Ihre Wirkung ergibt sich aus einer kompetitiven Blockierung der ATP-Bindungsstelle am Rezeptor.

Die Inhibierung des EGF-R erfolgte durch Inkubation der Zellen mit jeweils 5  $\mu\text{M}$  Compound 32 bzw. Compound 56 für 1 h vor der Behandlung der Zellen mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder 15  $\mu\text{M}$  FS für 8 h. Die Aktivierung von AKT und ERK1/2 wurde mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper in Western Blots immunologisch nachgewiesen.

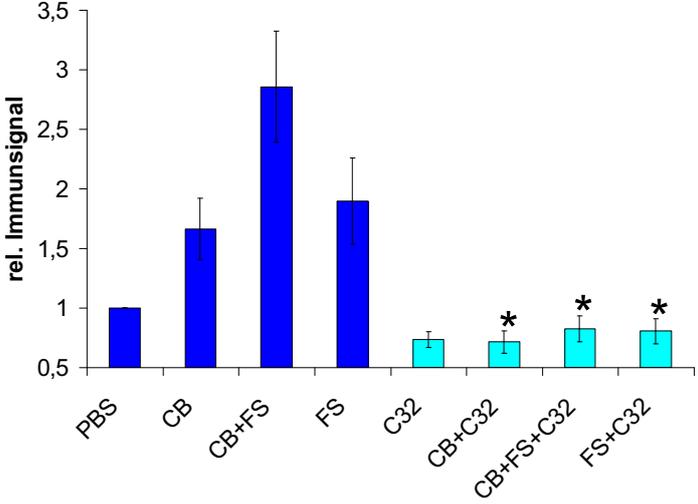
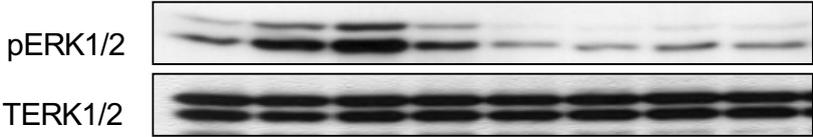
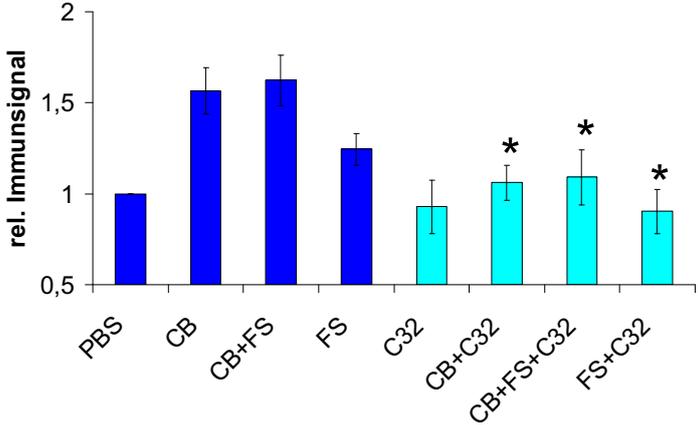
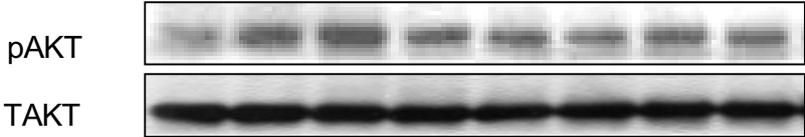
Die in Abb. 3.15a und b dargestellten densitometrischen Auswertungen zeigen eindeutig, dass die Inhibierung des EGF-R durch Compound 32 bzw. 56 zu einer vollständigen Hemmung der CB-induzierten AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung mit und ohne FS führte. Die FS-induzierte Phosphorylierung wurde ebenfalls gänzlich unterdrückt.

Neben seiner Beteiligung an der Vermittlung ROS-induzierter Effekte wird der EGF-Rezeptor selbst auch als Mediator von ROS-Entstehung diskutiert (Bae *et al.* 1997). Vor diesem Hintergrund wurde die Rolle des EGF-R an der partikelabhängigen ROS-Generierung untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 0,1% DMSO (Lösungsmittelkontrolle) und 5  $\mu\text{M}$  Compound 32 bzw. Compound 56 für 1 h vorinkubiert, und mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  CB und/oder 15  $\mu\text{M}$  FS für 4 h behandelt. Anschließend erfolgten die Beladung der Zellen mit dem fluorogenen Farbstoff  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  und die Fluoreszenz-Analysen am FACS-Gerät.

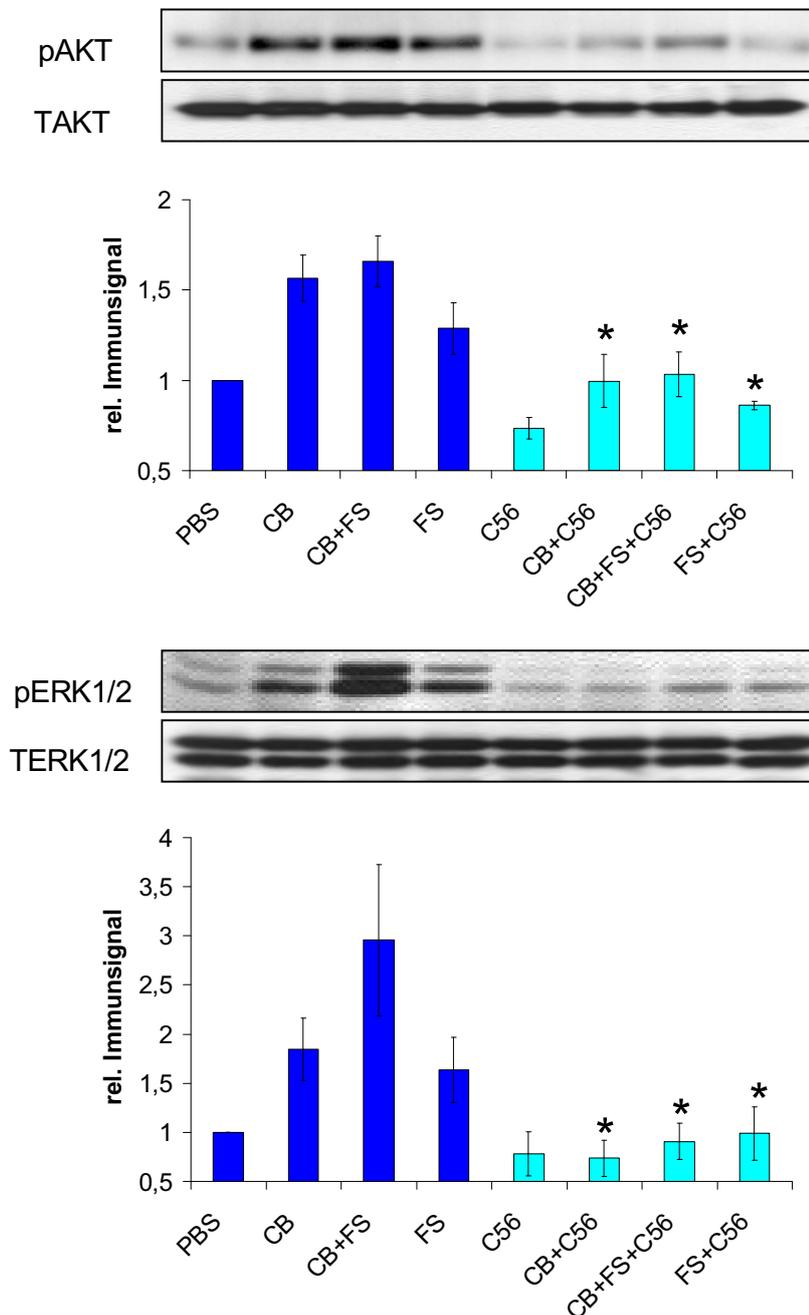
Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen, dass die Inhibierung des EGF-R zu keiner signifikanten Abnahme der DCF-Fluoreszenz in den CB- und CB+FS-behandelten Zellen führte (Abb. 3.16). Dagegen wurde in den FS-behandelten Zellen die induzierte Fluoreszenzintensität auf Kontroll-Niveau reduziert.

Den Ergebnissen zufolge verläuft sowohl die CB- als auch die FS-induzierte Aktivierung von AKT und ERK1/2, auf der Ebene von Zelloberflächen-Rezeptoren, über einen gemeinsamen EGF-R-abhängigen Weg. Es wird zudem auf eine mögliche Beteiligung der EGF-R-Aktivität an der Bildung FS-abhängigen intrazellulären ROS hingedeutet.

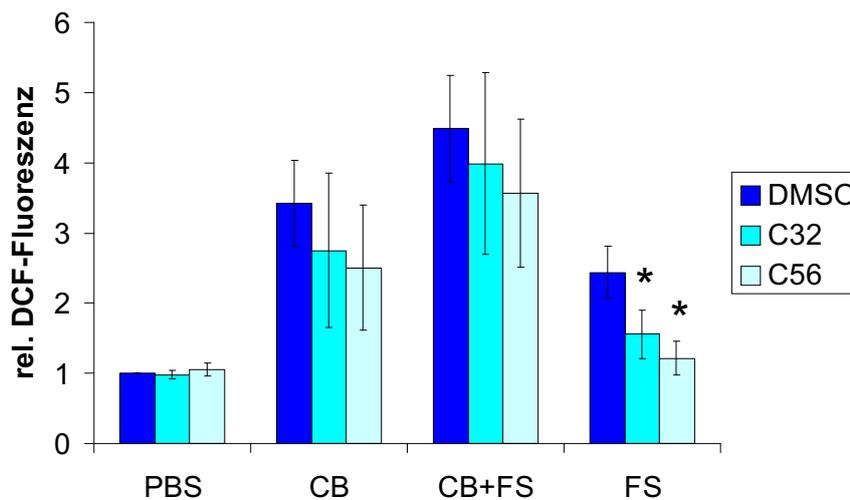
a Inhibierung der EGF-R-vermittelte Signaltransduktion mit Compound 32



## b Inhibierung der EGF-R-vermittelte Signaltransduktion mit Compound 56



**Abb. 3.15 Inhibierung des EGF-R durch Compound 32 (C32) oder Compound 56 (C56) und deren Einfluss auf die CB/FS-induzierte AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 5  $\mu$ M Compound 32 (a) oder Compound 56 (b) vorbehandelt, und anschließend für 8 h mit 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15  $\mu$ M FS belastet. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von Phospho-AKT (pAKT) und Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine AKT und ERK1/2 (TAKT und TERK1/2) diente als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zu nicht vorbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.16 Inhibierung des EGF-R durch Compound 32 (C32) oder Compound 56 (C56) und deren Einfluss auf die CB/FS-induzierte intrazelluläre ROS-Generierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 5  $\mu$ M Compound 32 oder Compound 56 bzw. 0,1% DMSO vorbehandelt, und anschließend für 4 h mit 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15  $\mu$ M FS belastet. Danach wurden die Zellen mit 20  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA in HBSS(+/-) beladen, trypsiniert und deren DCF-Fluoreszenz im FACS-Gerät gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der durchschnittlichen DCF-Fluoreszenz von jeweils 10000 lebenden Zellen in Relation zur DMSO-Kontrolle. \* signifikant unterschiedlich zu nicht vorbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ).

Eine weitere Gruppe wichtiger Oberflächen-Rezeptoren sind die Integrine, deren Aktivität mit Hilfe spezifischer Inhibitoren (Antikörper und synthetische Peptide) blockiert werden kann.

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Hamster-Anti-Ratte CD29 ( $\beta$ 1-Integrin) lässt sich die  $\beta$ 1-Integrin gerichtete Signaltransduktion vom extrazellulären Raum ins Zellinnere (*outside-in signaling*) blockieren. Der Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne der  $\beta$ 1-Integrin, wodurch die Bindung an der extrazellulären Matrix (EZM) verhindert wird. Ein monoklonaler Maus-Anti-Hamster Antikörper kann dabei als Negativ-Kontrolle verwendet.

Ein weiterer Ansatz zur Hemmung von Integrinen ist die Anwendung eines Peptids (H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH, RGDS), welches die Erkennungssequenz RGD von EZM-Proteinen darstellt, und von Integrinen gebunden wird (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Ein RGD-Überschuss führt dann zur Sättigung der EZM-Bindungsstellen von Integrinen. Als Negativ-Kontrolle hierzu dient das Sequenz-abgewandelte Peptid GRADSP (H-Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-OH).

Die Integrin-Blockierung erfolgte durch Inkubation der Zellen mit jeweils 1  $\mu$ g/ml Anti-CD29 bzw. 10  $\mu$ M RGDS für 1 h. Zellen zur Negativ-Kontrolle wurden

dementsprechend mit 1 µg/ml Maus-Anti-Hamster Antikörper bzw. 10 µM GRADSP vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µg/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15 µM FS für 8 h behandelt. Die Aktivierung von AKT und ERK1/2 wurde mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper in Western Blots immunologisch nachgewiesen.

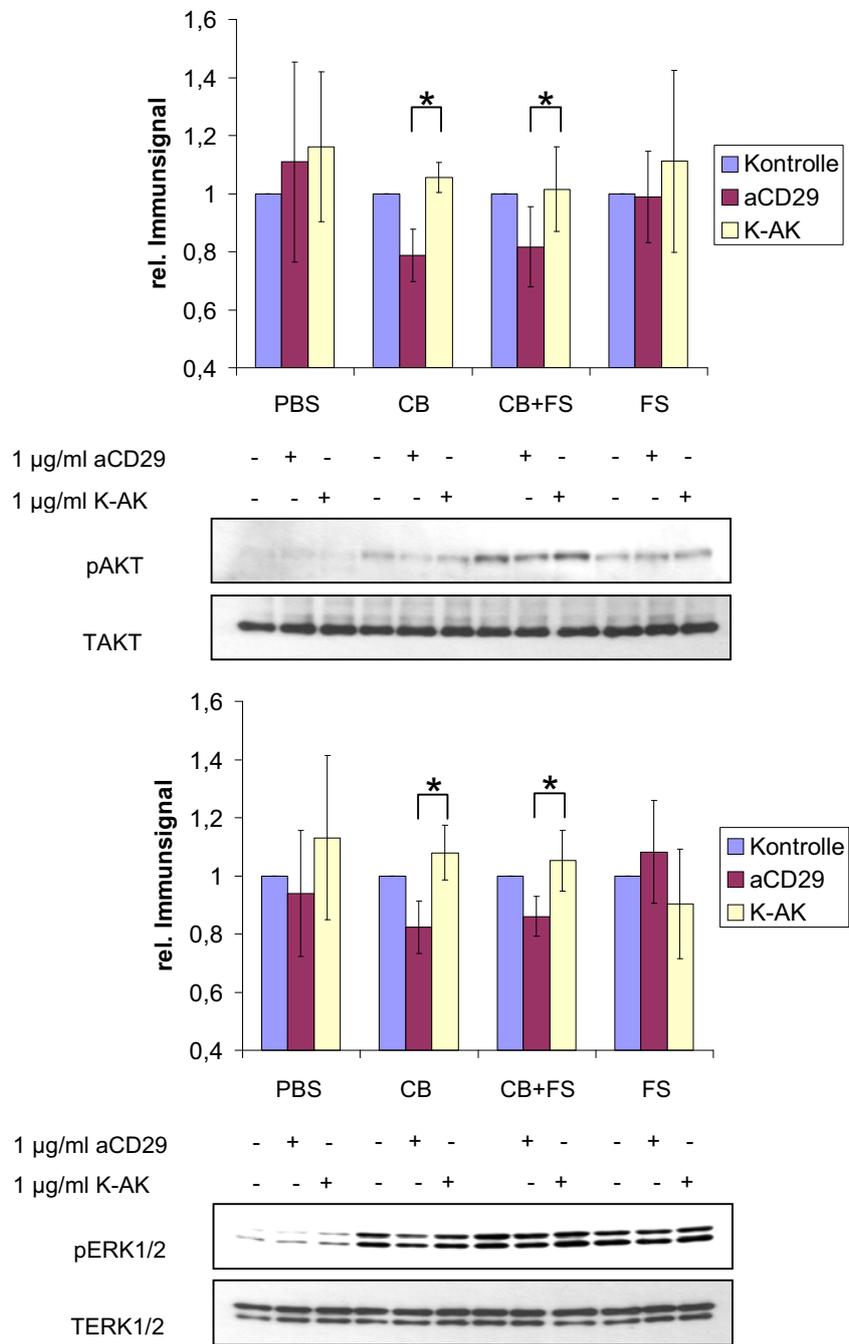
Die Ergebnisse sind in Abb. 3.17 a und b gezeigt. Die Inhibierung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion sowohl mit dem β1-Integrin blockierenden Antikörper als auch mit dem Integrin-bindenden Peptid führte zu einer signifikanten ca. 20%igen Abnahme der AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung in den Zellen, die mit CB und CB+FS behandelt wurden. Die FS-abhängige Phosphorylierung wurde hingegen durch die Inhibitoren nicht beeinflusst.

Eine mögliche Beteiligung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion an der partikelabhängigen ROS-Generierung wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurde die Zellen wie oben beschrieben mit den Integrin-Inhibitoren vorinkubiert, und anschließend mit 10 µg/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15 µM FS für 4 h behandelt. Danach erfolgten die Beladung der Zellen mit dem fluorogenen Farbstoff H<sub>2</sub>DCF-DA und die Fluoreszenz-Analysen am FACS-Gerät.

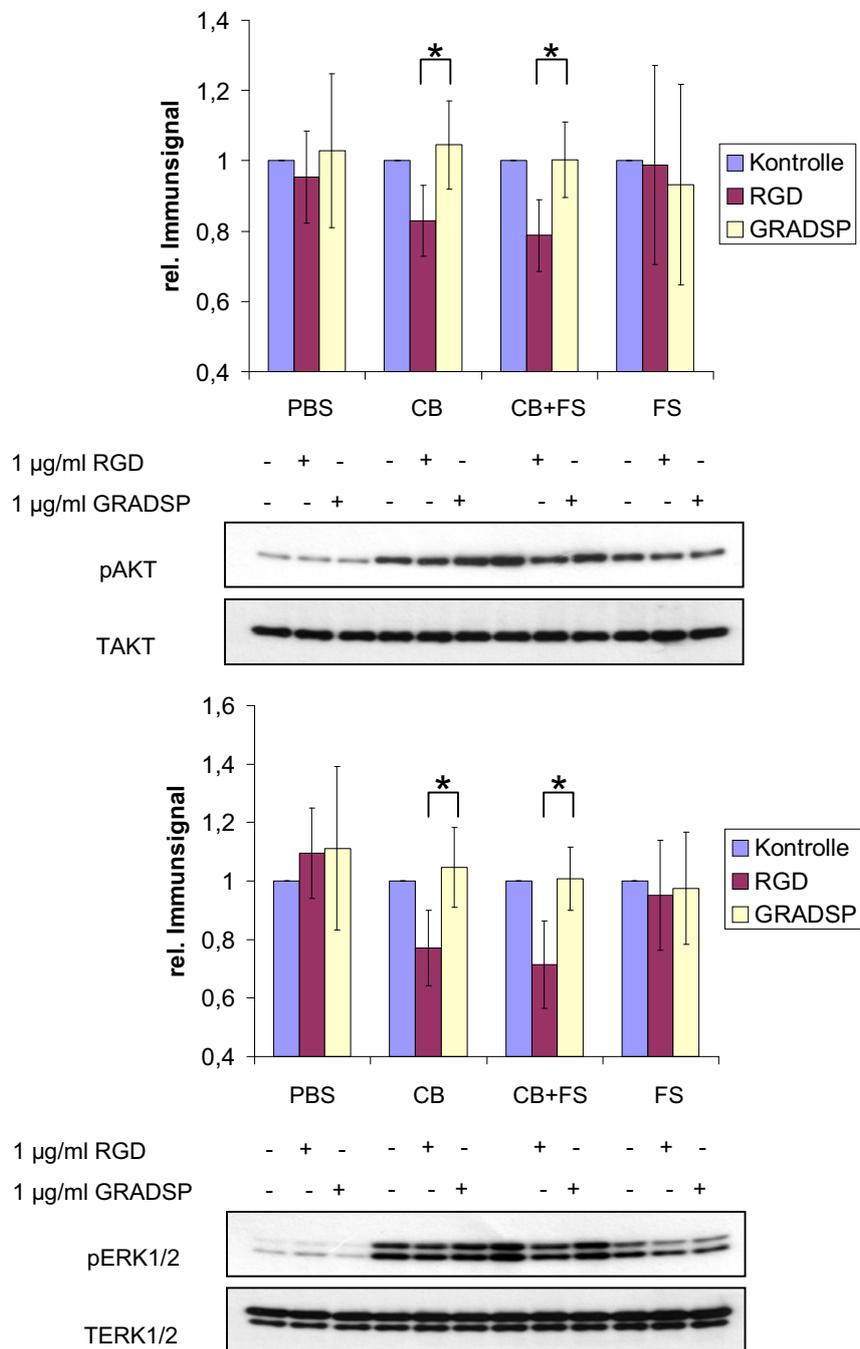
Die Integrin-Inhibierung hatte keinen Einfluss auf die CB/FS-abhängige intrazelluläre ROS-Bildung, wie dies in Abb. 3.18 erkennbar ist.

Die Ergebnisse belegen, dass Integrine an der Vermittlung von Signaltransduktionseffekten beteiligt sind, die durch CB induziert werden. Obwohl FS gleiche Effekte induziert, werden diese von Integrienen nicht beeinflusst. Somit scheint die parallele Aktivierung von EGF-R und Integrine eine gewisse selektive Spezifität für den Partikelkern zu besitzen.

**a Blockierung der  $\beta$ 1-Integrin-vermittelte Signaltransduktion mit Anti-CD29**

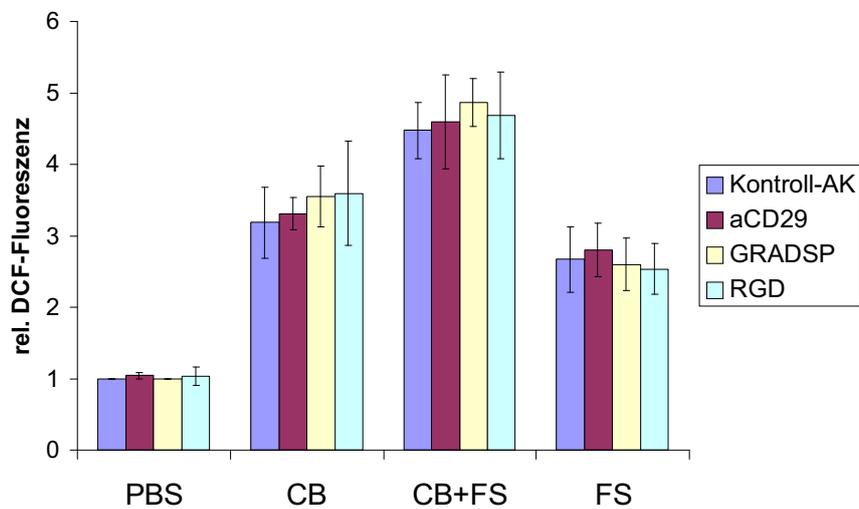


## b Blockierung der Integrin-vermittelte Signaltransduktion mit RGD



**Abb. 3.17 Inhibierung von Integrinen durch den  $\beta$ 1-Integrin-blockierenden Antikörper aCD29 oder das RGDS-Peptid und deren Einfluss auf die CB/FS-induzierte AKT- und ERK1/2-Phosphorylierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 1  $\mu\text{g/ml}$  aCD29 bzw. Kontroll-Antikörper (K-AK) (a) oder 10  $\mu\text{M}$  RGD-Peptid bzw. GRADSP-Kontrollpeptid (b) vorbehandelt, und anschließend für 8 h mit 10  $\mu\text{g/cm}^2$  CB und/oder 15  $\mu\text{M}$  FS belastet. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Immunsignalintensität von Phospho-AKT (pAKT) und Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die entsprechende CB/FS-Belastung. Der Nachweis der Gesamtproteine AKT und ERK1/2

(TAKT und TERK1/2) diente als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur Vorbehandlung mit Kontroll-Antikörper (a) bzw. GRADSP-Kontrollpeptid (b) ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.18 Inhibierung von Integrinen durch den  $\beta$ 1-Integrin-blockierenden Antikörper aCD29 oder das RGDS-Peptid und deren Einfluss auf die CB/FS-induzierte intrazelluläre ROS-Generierung:** RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 1  $\mu$ g/ml aCD29 bzw. Kontroll-Antikörper (K-AK) oder mit 10  $\mu$ M RGDS-Peptid bzw. GRADSP-Kontrollpeptid vorbehandelt, und anschließend für 4 h mit 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> CB und/oder 15  $\mu$ M FS belastet. Danach wurden die Zellen mit 20  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA in HBSS(+/-) beladen, trypsinisiert und deren DCF-Fluoreszenz im FACS-Gerät gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der durchschnittlichen DCF-Fluoreszenz von jeweils 10000 lebenden Zellen in Relation zur PBS-Kontrolle.

## 4. Diskussion

Eine starke Belastung der Atemluft mit Umweltpartikeln steht in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten oder die Verschlimmerung von negativen gesundheitlichen Effekten. Davon sind insbesondere die Atemwege und das Herz-Kreislauf-System betroffen. Dieser Zusammenhang wird von zahlreichen epidemiologischen Studien belegt, die zugleich die Notwendigkeit von geeigneten Maßnahmen zur Reduzierung der Staubbelastung zum Schutz der Bevölkerung aufzeigen (USEPA 2004; WHO 2005). Gegenwärtig wird die Konzentration an inhalierbaren Partikeln, welche einen aerodynamischen Durchmesser kleiner als  $10\ \mu\text{m}$  (*particulate matter*,  $\text{PM}_{10}$ ) aufweisen, als Messgröße für die Luftqualität bezüglich der Verunreinigung durch Feinstaub herangezogen (EU 1999). Auf dieser Weise wird jedoch impliziert, dass sämtliche Luftpartikel das gleiche Gefährdungspotential in sich bergen, ungeachtet ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften. Im Rahmen einer genaueren Risikoabschätzung sind umfassende Kenntnisse über die Ursachen partikelassoziierter Effekte erforderlich. Dazu bedarf es u. a. der Identifizierung der relevanten Parameter sowie der Wirkungsmechanismen, die zur Toxizität von Partikeln beitragen.

$\text{PM}_{10}$  stellt ein komplexes Gemisch unterschiedlicher und variabler Größe und Zusammensetzung dar. Die darin enthaltene Fraktion von ultrafeinen Partikeln (UFP) wird als hauptsächlicher Auslöser von umweltstaubbedingten Krankheitsbildern angesehen (Oberdörster *et al.* 1995, Seaton *et al.* 1995). UFP besitzen einen aerodynamischen Durchmesser kleiner als 100 nm, und stammen vorwiegend aus Verbrennungsprozessen. Der Kohlenstoffkern und daran gebundene organische Stoffe sowie Übergangsmetalle werden auf Grund ihrer jeweiligen chemischen und biologischen Reaktivität als die toxikologisch relevanten Hauptkomponenten verbrennungsgenerierter UFP betrachtet (Donaldson *et al.* 2005).

Die Lunge ist das erste Zielorgan und Haupteintrittspforte für inhalierbare Partikel in den Organismus. UFP sind in der Lage bis in den alveolären Raum zu gelangen und dort mit Zellen des Lungenepithels zu interagieren (Hoet *et al.* 2004). Darauf hin kann eine Reihe pathogener Antworten (z. B. Proliferation, Apoptose, Entzündung) hervorgerufen werden, deren Entstehungsmechanismen im Einzelnen noch unvollständig aufgeklärt sind.

Die derzeitige Hypothese zum molekularen Mechanismus der Partikeltoxizität geht von der Aktivierung von Zelloberflächen-Rezeptoren und der nachfolgenden Induktion von Signaltransduktionswegen hin zu den entsprechenden zellulären Endpunkten aus. Dabei hat die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativem Stress eine wichtige Funktion (Albrecht *et al.* 2004; Donaldson *et al.* 2005).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Effekte auf der Ebene der partikelinduzierten Signaltransduktion in Lungenepithelzellen. Im Mittelpunkt der Analysen stand der gegenseitige Einfluss der Hauptkomponenten verbrennungsgenerierter UFP auf Signalwege, die in Verbindung mit Zellproliferation und/oder Apoptose stehen. Hierzu wurde ein definiertes System von Modell-UFP genutzt, das aus repräsentativen umweltstaubrelevanten Stoffen aufgebaut war: ultrafeiner Kohlenstoff (CB, Partikelkern), Benzo[a]pyren (BaP, polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff) und Eisensulfat (FS, Übergangsmetall). Die Untersuchung partikelgenerierter ROS sowie die Beteiligung der Zellmembran-Rezeptoren EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen bildeten weitere zentrale Punkte zur Aufklärung der möglichen initialen Ereignisse, die bei der Induktion bzw. Vermittlung der partikelinduzierten Signalkaskaden eine Rolle spielen.

#### **4.1 Modulatorische Effekte von BaP und FS auf die CB-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung**

Ultrafeine CB-Partikel induzieren eine simultane Aktivierung von AKT und ERK1/2 in alveolären Typ II Lungenepithelzellen der Ratte (RLE-6TN-Zellen) (Unfried *et al.* 2008). Dabei bilden beide Proteine Teile eines gemeinsamen proliferativen Signalweges, bei dem die ERK1/2-Aktivierung von der AKT-Aktivierung abhängt. Anknüpfend an diesen Befund wurde der Einfluss der organischen bzw. metallischen Fraktion von verbrennungsgenerierten Umweltpartikeln auf die AKT- und ERK1/2-Aktivierung mit Hilfe eines Modellpartikel-Systems untersucht (Abb. 3.1).

BaP-beschichtete ultrafeine CB-Partikel (CBBaP) induzieren nach 8 h Behandlung der Zellen die AKT- und ERK1/2-Aktivierung in einem vergleichbaren Ausmaß wie die unbeschichteten Partikel. Das partikelgebundene BaP hat somit auf den beschriebenen CB-Effekt keinen Einfluss. Modulatorische Effekte von BaP auf partikelinduzierte Endpunkte sind bisher wenig untersucht worden. Gleiche BaP-

beschichtete Partikel, wie in dieser Arbeit verwendet, sind kürzlich in einer Studie eingesetzt worden, die sich mit partikelinduzierten DNA-Schäden in alveolären Typ II-ähnlichen Zellen aus menschlichem Adenokarzinom (A549-Zellen) befasste (Mroz *et al.* 2008). Es wurde u. a. gezeigt, dass CB spezifisch DNA-Einzelstrangbrüche und Veränderungen des Zellzyklus-Status induziert. Auf diesen Effekt hatte die BaP-Beschichtung der Partikel jedoch keinen Einfluss. Des Weiteren wurde als Folge der ROS-abhängigen DNA-Schädigung eine CB-induzierte p53-Aktivierung beschrieben, die bei den BaP-beschichteten Partikeln ausblieb. Auf diesen inhibitorischen Effekt des BaP wurde in der Studie allerdings nicht weiter eingegangen.

Synergistische Effekte von CB und BaP wurden im Rahmen der partikelinduzierten Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ ) und Apoptose in Maus-Makrophagen beschrieben, die mit der Aktivierung von MAP-Kinasen in Verbindung gesetzt wurden (Chin *et al.* 1998). In derselben Zelllinie wurden ebenfalls modulatorische BaP-Effekte auf die CB-abhängige Expression des Stress-induzierbaren Enzyms Hämoxxygenase 1 (HO-1) gezeigt (Chin *et al.* 2003). BaP-Einflüsse auf partikelabhängige Effekte könnten folglich je nach Zelltyp über andere Signalwege ablaufen als die hier untersuchten, oder aber selbst eine Zellspezifität besitzen. In dieser Hinsicht wurde kürzlich von der BaP-bedingten Induktion der Zellzyklus-Progression in Lungenfibroblasten aus dem menschlichen Embryo berichtet, die über eine p53-abhängige Aktivierung von AKT und ERK1/2 vermittelt war (Gao *et al.* 2007; Jiao *et al.* 2008). Eine solche BaP-induzierte Aktivierung dieses Signalweges wurde in dem verwendeten Zellsystem dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet.

Im Gegensatz zu BaP induziert FS in Kombination mit CB bzw. CBBaP eine signifikant stärkere Aktivierung von AKT und ERK1/2 als die Partikel alleine. Dieser modulatorische Effekt wird in Zusammenhang mit der partikelinduzierten Signaltransduktion durch diese Arbeit erstmalig gezeigt. Die gleichzeitig auftretende Verstärkung der Aktivierung beider Proteine legt die Vermutung nahe, dass CB und FS die Aktivierung über einen gemeinsamen Mechanismus induzieren. Bislang sind ähnliche Einflüsse von Übergangsmetallen auf Partikel-Effekte nur in Verbindung mit der Induktion von oxidativem Stress und Entzündung beschrieben worden. So verursachten künstlich erzeugte Rußaerosole in Kombination mit ultrafeinen Eisenpartikel *in vivo* einen synergistischen Anstieg von oxidativem Stress und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der Rattenlunge (Zhou *et al.* 2003). *In*

*vitro* Untersuchungen in Maus-Makrophagen zeigten ebenfalls synergistische Effekte von verschiedenen Übergangsmetallsalzen (darunter FeSO<sub>4</sub> und FeCl<sub>3</sub>) auf die CB-induzierte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung sowie oxidativen Stress (Wilson *et al.* 2002, 2007).

Die simultane Aktivierung von AKT und ERK1/2 durch FS ohne Partikel, in vergleichbarem Ausmaß wie CB, wird hier auch erstmals gezeigt. Dieser Effekt unterstreicht die Gemeinsamkeit und Bedeutung dieses Signalweges für die Induktion von zellulären Ereignissen durch UFP als Umweltnoxen. Der Befund widerlegt eine These von Samet *et al.* (1998), wonach Fe nicht in der Lage ist, die Aktivierung von MAP-Kinasen zu induzieren. In der Studie wurde die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 durch Salze verschiedener Übergangsmetalle in humanen bronchialen Epithelzellen untersucht. Im Gegensatz zu den meisten der untersuchten Metallen (As, Cr, Cu, V, Zn), zeigte Fe bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M nach 20 min Behandlung keine Aktivierung der MAP-Kinasen. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zeitpunkt auch keine FS-induzierte ERK1/2-Aktivierung beobachtet. Durch die unten beschriebene Zeitreihe war es jedoch möglich, eine FS-abhängige ERK1/2-Aktivierung zu einem früheren Zeitpunkt nachzuweisen, wobei die eingesetzte FS-Konzentration von 15  $\mu$ M ca. 30mal niedriger lag, als die in der o. g. Studie.

Eisen kann über Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktionen an der Entstehung von ROS beteiligt sein. Die ROS-Bildung stellt ein initiales Ereignis dar, das möglicherweise früh einsetzt, und dadurch die Signaltransduktion kurz nach der Partikelbelastung beeinflussen könnte. Ferner wird eine frühzeitige partikelabhängige Aktivierung proliferativer Signalkaskaden in Verbindung mit der Entstehung einer autokrinen Aktivierungsschleife diskutiert (Blanchet *et al.* 2004; Tamaoki *et al.* 2004). Daher wurde die AKT- und ERK1/2-Aktivierung nach kurzzeitiger Belastung der Zellen mit CB und oder FS untersucht (Abb. 3.4). FS induziert eine simultane und signifikante Aktivierung von Akt und ERK1/2 nach 5 min Behandlung. In Kombination mit CB ist diese Aktivierung vermindert, und mit reinem CB minimal (ERK1/2) bzw. nicht vorhanden (AKT). Der beobachtete Effekt verschwindet jedoch innerhalb der folgenden 5 min und ist bis zu einer Behandlungsdauer von 30 min nicht mehr festzustellen. Nach 8 h tritt dann das bereits beschriebene Phosphorylierungsmuster auf, wonach CB und FS jeweils eine miteinander vergleichbare Aktivierung von AKT und ERK1/2 induzieren, die in der CB+FS-Kombination verstärkt wird (Abb. 3.5).

Die Ursache für den kurzzeitigen FS-Effekt und dessen raschen Abklingen ist nicht geklärt. Möglicherweise stellt die Aktivierung eine zelluläre Antwort auf den plötzlichen Anstieg der Eisenkonzentration im Medium und damit der ROS-Bildung dar. Das schnelle Eingreifen von antioxidativen Substanzen bzw. Enzymen sowohl im serumhaltigen Medium als auch in der Zelle könnten den Effekt unterbinden, und damit eine Erklärung für die Wiederherstellung der Hintergrundaktivität von AKT und ERK1/2 liefern. Das Auftreten der CB- und FS-induzierten Aktivierung sowie des verstärkenden FS-Effekts nach 8 h wären dann die Konsequenz einer anhaltenden und kumulativ gesteigerten extra- und/oder intrazellulären ROS-Entstehung, welche die antioxidative Kapazität der Zellen übersteigt (Li *et al.* 2008).

#### **4.2 Extra- und intrazelluläre ROS-Bildung und ihr Einfluss auf die CB/FS-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung**

Verbrennungsgenerierte Umweltpartikel wie auch eine Reihe industriell hergestellter Nanopartikel sind in der Lage, ROS-Entstehung und oxidativen Stress zu induzieren. Dieses Merkmal gilt als gemeinsamer Nenner, einleitender und vorantreibender Mechanismus pathogener Effekte (Donaldson *et al.* 2005; Li *et al.* 2008). Die Fähigkeit zur ROS-Bildung durch CB und/oder FS wurde in dieser Arbeit sowohl in zellfreiem Medium als auch intrazellulär überprüft. Damit wurden zunächst mögliche modulatorische Effekte von FS auf die CB-induzierte ROS-Generierung untersucht. Um eine Verbindung zwischen den extra- bzw. intrazellulär gebildeten ROS und der CB/FS-induzierten Signaltransduktionseffekten herzustellen, wurden anschließend Analysen mit entsprechenden chemischen und enzymatischen ROS-Inhibitoren durchgeführt.

##### **4.2.1 ROS-Generierung in zellfreiem Medium und intrazellulär**

Die Bildung von extrazellulären ROS wurde in zweierlei zellfreien Systemen untersucht. Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) diente zum Nachweis von Hydroxyl-Radikalen ( $\cdot\text{OH}$ ) in wässrigem Medium mit Hilfe der Elektronen-Spin-Falle (*spintrap*) DMPO. Zum Einleiten der (Fenton- bzw. Haber-Weiss-) Reaktion wurden die Versuche in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt. Wenn auch dadurch die Bedingungen und Ereignisse im Zellkulturmedium nicht

getreu wiedergegeben werden, so werden doch Hinweise auf das intrinsische Potential der Partikel geliefert, kurzlebige und i. d. R. hochreaktive Radikale zu generieren. Mit dieser Technik wurde die  $\cdot\text{OH}$ -Bildung durch verschiedene Umweltpartikelproben und darin vorkommende Übergangsmetalle in verschiedenen Studien bereits nachgewiesen (Borm *et al.* 2007).

FS induziert nach 15 min Inkubation mit DMPO und  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine deutliche  $\cdot\text{OH}$ -Generierung, die in der Kombination mit CB signifikant reduziert wird (Abb. 3.6a und b). Reines CB führt dabei zu keiner gesteigerten  $\cdot\text{OH}$ -Induktion im Vergleich mit der Kontrolle. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten einer Studie von Shi *et al.* (2003) zur ESR-Analyse der  $\cdot\text{OH}$ -Bildung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung von Umweltpartikeln überein. Dort wurde die Fähigkeit zur  $\cdot\text{OH}$ -Generierung u. a. durch  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  gezeigt, die innerhalb von Sekunden bzw. Minuten eintrat. In derselben Arbeit führten unterschiedliche Übergangsmetalle in Kombination mit CB-Partikel zu unterschiedlich starken ESR-Signalen, dabei waren diese für  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  viel niedriger als z. B. für  $\text{Cu}^{2+}$ . Ein direkter und quantitativer Vergleich der induzierten  $\cdot\text{OH}$ -Bildung durch CB, CB+Metall und Metall wurde in der Studie jedoch nicht untersucht.

Die ESR-Analysen wurden nach Filtrierung der Reaktionsansätze durchgeführt. Die Entfernung der CB-Partikel erwies sich als notwendiger Schritt aufgrund einer in Vorversuchen festgestellten Partikel-Interferenz mit der ESR-Messung. Eine technisch bedingte unzureichende Entfernung von CB könnte die verminderte  $\cdot\text{OH}$ -Bildung in der Kombination CB+FS erklären. Möglicherweise spielt aber auch die Partikel-Oberfläche eine Rolle. Die Oberfläche von UFP ist im Verhältnis zum Durchmesser stark vergrößert, und bietet sich als eine Grundlage an, die den Ablauf katalytischer Reaktionen begünstigt (Fubini *et al.* 1997; Oberdörster 2001, 2005). So ist es auch denkbar, dass die reaktive Oberfläche von CB eine rasche Umsetzung FS-induzierter  $\cdot\text{OH}$  in stabilere Sauerstoffspezies (wie etwa  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ermöglicht, welche mit dem verwendeten *spintrap* DMPO nicht mehr erfassbar sind.

Diese Hypothese wird unterstützt durch die fluorometrische Bestimmung des ROS-sensitiven Farbstoffes Dichlorohydrofluorescein (DCFH), einen zweiten zellfreien Ansatz zum Nachweis des oxidativen Potentials von CB und FS. Die Analysen erfolgten in serumreduziertem Medium, welches sonst zur Inkubation der Zellen vor der Partikelbehandlung diente. Dadurch kam der Ansatz den Ereignissen im

extrazellulären Raum unter Zellkulturbedingungen näher. CB-Partikel induzieren dosisabhängig eine deutliche ROS-Entstehung im zellfreien Medium (Abb. 3.7a und b). Die ROS-Bildung setzt unmittelbar nach Zusammenführen von Medium, Partikeln und Farbstoff ein, wie dies an einer bereits zu Beginn der Messung erhöhten Fluoreszenz detektierbar ist. Die induzierte ROS-Generierung steigt relativ zur Kontrolle innerhalb weniger Minuten an, und verläuft dann asymptotisch. D. h. die ROS-Neubildung bleibt in Relation zur Kontrolle näherungsweise konstant hoch. Die detektierte partikelinduzierte Fluoreszenz wird durch Inkubation mit Katalase erheblich reduziert, so dass sie größtenteils auf die Entstehung von  $H_2O_2$  zurückzuführen ist (Abb. 3.8).

In Anwesenheit von FS ist die CB-induzierte ROS-Entstehung erhöht, jedoch nicht als statistisch signifikant zu bewerten. FS ohne Partikel induziert in diesem Ansatz keine ROS-Bildung. Die Ergebnisse stimmen mit einer Arbeit von Wilson *et al.* (2002) zu Interaktionen zwischen UFP und Übergangsmetallen insofern überein, als dass dort eine minimale ROS-Generierung durch  $Fe^{2+}$  bzw.  $Fe^{3+}$  und eine Verstärkung (Potenzierung) der CB-induzierten ROS durch die Metalle in zellfreiem System festgestellt wurde. Der verstärkende Effekt ist wahrscheinlich von der Eisenkonzentration abhängig. Dort wurden  $100 \mu M$  der Metallsalze eingesetzt, und damit rund 7mal mehr als in der vorliegenden Arbeit. Solch eine hohe Konzentration war im Hinblick auf die hier schwerpunktmäßig untersuchten Signaltransduktions-effekte aufgrund der starken Zytotoxizität nicht relevant, wie diese im Vorfeld aus lichtmikroskopischen Beobachtungen erkannt worden war.

Der Nachweis von ROS in zellfreien Systemen lieferte erste Anhaltspunkte für die Ursache der gezeigten Signaltransduktionseffekte. Insbesondere die gesteigerte ROS-Generierung infolge einer Partikel-Metall-Interaktion, wie sie in dieser Arbeit beobachtet und in der Literatur beschrieben wird, gibt einen Hinweis auf die mögliche Verbindung zur verstärkenden Wirkung von FS auf die CB-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung. Bei der Induktion der partikel- und metallabhängigen Signalwege können jedoch auch intrazellulär generierte ROS eine Rolle spielen. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst die Fähigkeit von CB und FS zur Induktion von ROS-Entstehung innerhalb der Zelle untersucht.

Die Bildung intrazellulärer ROS wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des Farbstoffes 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ( $H_2DCF-DA$ ) nachgewiesen. Nach Aufnahme in die Zelle wird das  $H_2DCF-DA$  enzymatisch abgespalten, unter

Bildung des o. g. ROS-empfindlichen DCFH, dessen Oxidation zum stark fluoreszierenden DCF führt (Bass *et al.* 1983). Nach einer 4-stündigen Behandlung führen CB und FS sowohl unabhängig voneinander als auch in Kombination zu einer dosisabhängigen und signifikant erhöhten intrazellulären ROS-Bildung in der Reihenfolge FS < CB < CB+FS (Abb. 3.9). Somit bewirkt FS eine Verstärkung der intrazellulär CB-induzierten ROS-Entstehung. Dieser Befund steht teilweise im Gegensatz zur oben erwähnten und einer weiteren Studie (Wilson *et al.* 2002, 2007). Dort wurde in Maus-Makrophagen weder eine ROS-Induktion allein durch Übergangsmetalle noch eine metallabhängige Potenzierung der CB-induzierten intrazellulären ROS-Bildung detektiert. Die in der Studie diskutierte antioxidative Kapazität von Makrophagen durch Eisen-Sequestrierung bzw. -Chelatbildung deutet darauf hin, dass eine mögliche Zelltypspezifität nicht auszuschließen ist. So beschreibt eine kürzlich erschienene Arbeit zu Effekten von Eisenoxid-Nanopartikeln auf Permeabilität und Mikrotubuli-Struktur in menschlichen Endothelzellen ähnliche Effekte wie die hier gezeigten. Diese Partikel induzieren in zellfreiem Medium keine ROS, die intrazelluläre ROS-Generierung konnte dennoch detektiert werden (Apopa *et al.* 2009).

Insgesamt zeigt sich für die intrazellulär auftretenden ROS, im Vergleich mit den extrazellulären, eine stärkere Korrelation mit den CB- und FS-induzierten Signaltransduktionseffekten. Nachfolgende Inhibitionsstudien dienen dazu, diese Zusammenhänge näher zu untersuchen.

#### **4.2.2 Verbindung zwischen extra-/intrazellulären ROS und der CB/FS-induzierten AKT und ERK1/2-Aktivierung**

Nachdem die pro-oxidativen Eigenschaften der Partikel nachgewiesen wurden, wurde der Frage nachgegangen, ob und inwiefern extra- und intrazellulär gebildete ROS sowohl mit den partikelinduzierten Signaltransduktionseffekten als auch miteinander in Verbindung stehen. Durch exogene Zugabe von Katalase und Superoxid-Dismutase (SOD) sollte die Wirkung neugebildeter ROS im extrazellulären Raum unterbunden werden. Dieser Ansatz ist als spezifisch für extrazelluläre ROS anzusehen, da die Enzyme nicht in die Zelle eindringen, und somit intrazelluläre ROS nicht beeinflussen (Abb. 3.11). Beide Enzyme bilden einen Teil des antioxidativen Systems zum Schutz der Zelle vor oxidativem Stress, indem ROS zu

unschädlicheren Spezies umgesetzt werden. Intrazellulär gebildete ROS werden u. a. auch durch Glutathion (GSH) inhibiert. Die Zugabe von N-Acetyl-cystein (NAC) bewirkt die Ankurbelung der GSH-Synthese, wodurch eine hohe antioxidative Kapazität der Zelle aufrechterhalten wird (Fridovich & Freeman 1986). Bei der partikelinduzierten ROS-Generierung wird auch die Beteiligung von NADPH-Oxidasen diskutiert, deren Aktivität mit dem pharmakologischen Inhibitor Diphenyliodonium (DPI) blockiert werden kann (Amara *et al.* 2007; Deshpande *et al.* 2002).

Durch Katalase und SOD wird jeweils die CB/FS-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung moderat aber signifikant inhibiert (Abb. 3.10). Demnach besteht ein Zusammenhang zwischen den extrazellulär generierten ROS und den Signaltransduktionseffekten. Die Inhibierung der FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung widerspricht allerdings den Ergebnissen aus der zellfreien DCF-Fluoreszenzmessung, wonach FS keine ROS-Bildung im Zellkulturmedium hervorruft. Die in den Western-Blot-Analysen implizierte ROS-Entstehung beruht möglicherweise auf (Redox-) Ereignissen, die erst durch Interaktion des FS mit den Zellen auf der Ebene der Membran stattfinden (Barchowsky & O'Hara 2003). Die mäßige Inhibierung der AKT- und ERK1/2-Aktivierung deutet ferner darauf hin, dass extrazellulär induzierte ROS zwar merklich, dennoch nicht ausschlaggebend, zum Auftreten der Signaltransduktionseffekte beitragen. Dadurch kommt den durch die Partikel intrazellulär generierten ROS eine gewichtigere Rolle zu. Diese sind allerdings keine Folge der extrazellulären ROS-Bildung, da sie durch die Behandlung mit Katalase und SOD nicht beeinflusst werden (Abb. 3.11). Ein ähnlicher Effekt wurde in menschlichen bronchialen Epithelzellen (BEC) in Verbindung mit der intrazellulären ROS-Induktion durch Silikapartikel beobachtet (Deshpande *et al.* 2002).

Die Behandlung mit NAC führt zu einer vollständigen Inhibierung der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung (Abb. 3.12). Auch die intrazelluläre ROS-Bildung wird durch NAC deutlich unterdrückt (Abb. 3.15). Der partikelbedingte oxidative Stress in der Zelle spielt demnach eine entscheidende Rolle bei der induzierten Signaltransduktion. Mehrere Arbeiten mit verbrennungsgenerierten Partikeln haben den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Aktivierung von Signalwegen, etwa über MAP-Kinasen, gezeigt (Donaldson *et al.* 2005; Li *et al.* 2008). Ein oft kontroverser Punkt ist dabei die Frage, welche

Partikelkomponente(n) für die oxidativen Effekte und folglich für die induzierte Signaltransduktion verantwortlich ist (sind). In Abhängigkeit vom Partikelursprung (z. B. Dieselruß, Umweltstaub oder industrielle UFP) werden oxidative und/oder Signaltransduktionseffekte auf jeweils die organische, metallische oder Partikelkern-Fraktion zurückgeführt (Hashimoto *et al.* 2000; Kawasaki *et al.* 2001; Kim *et al.* 2006; Sydlík *et al.* 2006; Tamaoki *et al.* 2004; Wu *et al.* 2002). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl der Partikelkern (CB) als auch die metallische Fraktion (FS) in der Lage sind, in einer sich gegenseitig verstärkender Weise oxidativen Stress auszulösen, und dass dieser in direkter Verbindung zur jeweiligen Induktion der AKT- und ERK1/2-Aktivierung steht.

Ob NADPH-Oxidasen an der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung beteiligt sind, ist weniger deutlich. Auf dem ersten Blick führt die Behandlung mit DPI zu einer leichten Inhibierung der AKT-Aktivierung nach CB+FS-Behandlung, und zu einer ebenfalls leichten Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung durch CB und CB+FS (Abb. 3.13). Die FS-induzierte Aktivierung bleibt in beiden Fällen unverändert. DPI alleine zeigt allerdings eine signifikante dosisabhängige Aktivierung von AKT und ERK1/2. DPI ist kein spezifischer Inhibitor von NADPH-Oxidasen, sondern allgemein von Flavoproteinen (Li & Trush 1998), und könnte im Prinzip über andere spezifische oder unspezifische Wege zu diesen bislang nicht beschriebenen Effekten führen. Da sich der induzierende Effekt in den CB/FS-behandelten Zellen jedoch nicht widerspiegelt, besteht die Möglichkeit, dass hier zwei gegenläufige Mechanismen gleichzeitig stattfinden. Unter Berücksichtigung dieses Umstands gibt es für die Beteiligung von NADPH-Oxidasen an der partikelinduzierten Signaltransduktion nur ein Hinweis, der sich durch einen rechnerischen Abzug des induzierenden Effektes ergibt. Das dadurch erhaltene Bild, das auf eine dosisabhängige Inhibierung der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung hindeutet (Abb. 3.14), korreliert allerdings im Wesentlichen mit der DPI-abhängigen Inhibierung der intrazellulären ROS-Induktion (Abb. 3.15). Solche Zusammenhänge zwischen verbrennungsgenerierten Partikeln und adhären Zellen sind noch wenig untersucht worden. Es konnte bisher in A549-Zellen gezeigt werden, dass Dieselruß die Expression von Matrix-Metalloproteinase-1 über ROS-Bildung durch die analoge NADPH-Oxidase NOX4 und nachfolgende ERK1/2-Phosphorylierung induziert (Amara *et al.* 2007).

### **4.3 Beteiligung von EGF-Rezeptor und $\beta$ 1-Integrinen an der CB/FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung**

Nach der extrazellulären Matrix stellt die Membran die erste zelluläre Struktur dar, die eine Wechselwirkung mit Partikeln eingehen kann. Die darin befindlichen Zelloberflächen-Rezeptoren übernehmen eine Funktion als zentrale Schaltstellen zur Vermittlung bzw. Induktion von Signalkaskaden, die durch die Partikel-Zell-Interaktion ausgelöst werden, ob nun durch direkten physischen Kontakt oder indirekt über partikelgenerierte ROS (Albrecht *et al.* 2004; Unfried *et al.* 2007). Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass CB-Partikel in RLE-6TN-Zellen sowohl Apoptose als auch Proliferation unabhängig voneinander induzieren können (Sydlik *et al.* 2006). Während die Apoptose von der JNK1/2-Aktivierung abhängt, wird die Proliferation durch die Aktivierung von ERK1/2 spezifisch induziert. Da beide Signalwege von der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) abhängig sind, wird ein weiterer regulatorischer Mechanismus benötigt, um die Signaltransduktion zugunsten einer der beiden Endpunkte zu lenken. In dieser Hinsicht wurde gezeigt, dass die Beteiligung von  $\beta$ 1-Integrinen für die Induktion der Zellproliferation entscheidend ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass für den CB-induzierten proliferativen Weg die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in Abhängigkeit von EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen erforderlich ist (Unfried *et al.* 2008). Die AKT-Aktivierung ihrerseits ist Voraussetzung für die Induktion der nachfolgenden Aktivierung von ERK1/2.

Mit Hilfe zweier pharmakologischen Inhibitoren der Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-R wurde untersucht, ob der Rezeptor auch an der FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung sowie an der FS-abhängigen Verstärkung der entsprechenden CB-Effekte beteiligt ist. Die Blockierung des EGF-R durch die Inhibitoren Compound 32 und Compound 56 führt zu einer vollständigen Hemmung der CB-, CB+FS- und FS-abhängigen Aktivierung von AKT und ERK1/2 (Abb. 3.16a und b). Damit wird gezeigt, dass sowohl CB-Partikel als auch FS diese Signaltransduktionseffekte über einen gemeinsamen, EGF-R-vermittelten Weg induzieren. Der EGF-R scheint allgemein als initialer Vermittler UFP-induzierter Signaltransduktion eine wichtige Rolle zu spielen. Die Bedeutung des EGF-R/ERK1/2-Signalweges zeigt sich insbesondere bei der partikelinduzierten Zellproliferation in Lungenepithelzellen

(Sydlik *et al.* 2006; Tamaoki *et al.* 2004). In diesem Kontext wird auch die durch UFP induzierte Expression von EGF-R-Liganden (etwa HB-EGF oder Amphiregulin) diskutiert, die mit einer autokriner Aktivierungsschleife zur Aufrechterhaltung bzw. Ankurbelung des proliferativen Signals in Verbindung gebracht wird (Blanchet *et al.* 2004; Marano *et al.* 2002; Tamaoki *et al.* 2004). Auch Übergangsmetalle, die in Umweltpartikeln vorkommen, induzieren in Lungenepithelzellen die Aktivierung von MAP-Kinasen über einen EGF-R-vermittelten Weg (Samet *et al.* 1998; Wu *et al.* 1999). Die vorliegende Arbeit zeigt allerdings zum ersten Mal, nicht nur dass FS eine simultane Aktivierung von AKT und ERK1/2 induziert (s. 4.1), sondern auch dass diese in Abhängigkeit von oxidativem Stress und EGF-R-Aktivierung erfolgt.

Wie die UFP-induzierte EGF-R-Aktivierung im Einzelnen abläuft, ist bisher noch weitgehend unklar. Mit hoher Wahrscheinlichkeit spielen dabei die partikel-induzierten extra- und intrazellulären ROS, welche durch die Partikel selbst oder nach derer Interaktion mit zellulären Zielstrukturen generiert werden, eine zentrale Rolle (Donaldson *et al.* 2003; Li *et al.* 2008; Unfried *et al.* 2007). Die Aktivierung des EGF-R sowie weiterer Zellmembran-Rezeptoren lässt sich nachweislich durch ROS beeinflussen, wodurch entsprechende Signalwege ebenfalls moduliert werden. Der genaue Aktionsmechanismus von Aktivierung und Induktion von Signaltransduktion ist nicht vollständig geklärt. Dies wird u. a. dadurch erschwert, dass ROS prinzipiell jedes Biomolekül angreifen können, und damit auf Signalwege direkt und indirekt sowie stimulatorisch oder inhibitorisch einwirken können (Barthel & Klotz 2005). Eine heute verbreitete Hypothese, die auch im Rahmen der durch Übergangsmetalle induzierte Signaltransduktion behandelt wird, beschreibt Phosphatasen als ein für Signalkaskaden empfindliches Ziel von ROS (Abdelmohsen *et al.* 2003; Knebel *et al.* 1996; Tal *et al.* 2006). Demnach führt die ROS-bedingte Inhibierung verschiedener Phosphatasen (Protein-Tyrosin-, Lipid-, Serin/Threonin-Phosphatasen), die als regulatorische Gegenspieler der entsprechenden Kinasen fungieren, zur Störung der Inaktivierung von Signalwegen und letztendlich zu einer Netto-Aktivierung (Barthel & Klotz 2005). Ob dieser Mechanismus auch für die UFP-induzierte Signaltransduktion gilt, bleibt noch weitgehend unerforscht.

Interessanterweise ist der EGF-R nach Ligandenbindung selbst in der Lage, kurzzeitig ROS zu generieren, wodurch EGF-R-assoziierte Tyrosin-Phosphatasen inhibiert werden (De Yulia & Cárcamo 2005). Dabei scheint die intrinsische Kinase-Aktivität, nicht aber die Autophosphorylierungsstellen, des EGF-R von besonderer

Bedeutung zu sein (Bae *et al.* 1997). Die Möglichkeit einer Beteiligung des EGF-R an der CB/FS-induzierten intrazellulären ROS-Entstehung wurde unter Verwendung der EGF-R-Inhibitoren durchflusszytometrisch untersucht. Durch die Blockierung des EGF-R mit Compound 32 und Compound 56 kommt es zu einer leichten jedoch statistisch nicht signifikanten Abnahme der intrazellulären CB- und CB+FS-induzierten ROS-Generierung (Abb. 3.17). Damit gibt es keinen Beweis sondern lediglich einen Hinweis darauf, dass CB-Partikel EGF-R-vermittelt ROS induzieren könnte. Dagegen wird die FS-induzierte ROS-Entstehung durch die EGF-R-Inhibitoren fast vollständig unterbunden. Welche Mechanismen sich dahinter verbergen, bleibt noch unklar. Weiterführende Untersuchungen sollen helfen diese Effekte näher zu beschreiben, und zu klären, ob und inwiefern dies für die UFP-induzierte Signaltransduktion relevant ist.

Zusätzlich zum EGF-R wurde der Beitrag von  $\beta$ 1-Integrinen zur Induktion der AKT- und ERK1/2-Aktivierung durch CB und FS analysiert. Durch den Einsatz zweier blockierenden Agenzien,  $\beta$ 1-Integrin-Antikörper (anti-CD29) und RGD-Peptid, erfolgte die Inhibierung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion. Die CB- und CB+FS-induzierte Aktivierung von AKT und ERK1/2 wird dadurch in vergleichbarem Ausmaß signifikant gehemmt (Abb. 3.18a und b). Damit konnte die von Unfried *et al.* (2008) erstmalig beschriebenen Beteiligung von  $\beta$ 1-Integrinen an der CB-induzierten Proliferation über den PI3K/AKT/ERK1/2-vermittelten Signalweg bestätigt werden. Im Gegensatz dazu bleibt die FS-induzierte AKT- und ERK1/2-Aktivierung nach Integrin-Blockierung unverändert. Die in dieser Arbeit bis hierhin beschriebenen Untersuchungen zeigen gemeinsame molekulare Mechanismen (oxidativer Stress, EGF-R-Abhängigkeit) der CB- und FS-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung. Demgegenüber deuten die hier dargelegten Befunde auf eine Spezifität von  $\beta$ 1-Integrinen für die Vermittlung der CB-induzierten Signaltransduktion hin.

Die Beteiligung von Integrinen an der Induktion von Signalwegen durch Materialien im Nanometer-Bereich ist noch wenig erforscht. Hinweise darauf wurden hauptsächlich aus Studien mit Asbestfasern gewonnen (Albrecht *et al.* 2004). So wurden Integrine mit der Phagozytose von Asbestfasern sowie mit der asbest-induzierten Genexpression im Rahmen der Mesotheliom-Kanzerogenese in Verbindung gebracht (Liu *et al.* 2000; Sandhu *et al.* 2000b). Die asbestinduzierte simultane Aktivierung von AKT und ERK1/2 in Abhängigkeit von  $\beta$ 1-Integrinen ist

bisher allerdings in nur einer Studie an Mesothelzellen gezeigt worden (Berken *et al.* 2003). Entsprechend wenig ist über die zu Grunde liegenden Mechanismen der Aktivierung von Integrinen zur Vermittlung von partikel- bzw. asbestinduzierten Effekten bekannt. Die vorherrschende Meinung zur asbestabhängigen Signaltransduktion geht von der Entstehung von ROS an der (eisenhaltigen) Faseroberfläche bzw. während der Phagozytose aus (Shukla *et al.* 2003). Alternativ dazu besteht die Möglichkeit einer direkten physischen Interaktion von Fasern bzw. Partikeln mit den Zelloberflächen-Rezeptoren, oder aber mit der extrazellulären Matrix, was wiederum die Integrin-vermittelte Signaltransduktion beeinflussen kann (Albrecht *et al.* 2004).

Zusammengenommen zeigen die dargelegten Ergebnisse, dass sowohl der EGF-R als auch  $\beta$ 1-Integrine an der CB-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind, während FS-induzierte Effekte nur vom EGF-R abhängig sind. Noch ist unklar, ob bei der Induktion partikelspezifischer Signalkaskaden eine direkte Interaktion beider Zelloberflächen-Rezeptoren stattfindet. Eine Integrin-abhängige EGF-R-Phosphorylierung sowie die physikalische Wechselwirkung beider Rezeptoren ist bereits nachgewiesen worden (Moro *et al.* 1998). Bisher wurde gezeigt, dass sich solche Interaktionen zwischen EGF-R und Integrinen eine Auswirkung u. a. auf Zellzyklus-Regulation, Zellwachstum, -wanderung und -adhäsion haben können (Aplin & Juliano 1999; Bill *et al.* 2004; Eliceiri 2001).

#### **4.4 Einordnung der Arbeit**

Auf einer Linie mit vorangegangenen Studien zeigt die vorliegende Arbeit die Induktion der AKT- und ERK1/2-Aktivierung in Lungenepithelzellen durch CB, als Modell für den unlöslichen Kern von verbrennungsgenerierten Umweltpartikeln. Auf dieser Basis wurden mögliche Einflüsse durch Interaktionen von CB mit BaP und FS, stellvertretend für umweltrelevante polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Übergangsmetalle, untersucht.

Es wird erstmals gezeigt, dass FS ebenfalls die simultane Aktivierung von AKT und ERK1/2 induziert, und zugleich die CB-induzierte Aktivierung verstärkt. Dagegen hat partikelgebundenes sowie freies BaP keinen Einfluss, und spielt somit anscheinend keine Rolle im betrachteten Signaltransduktionsweg.

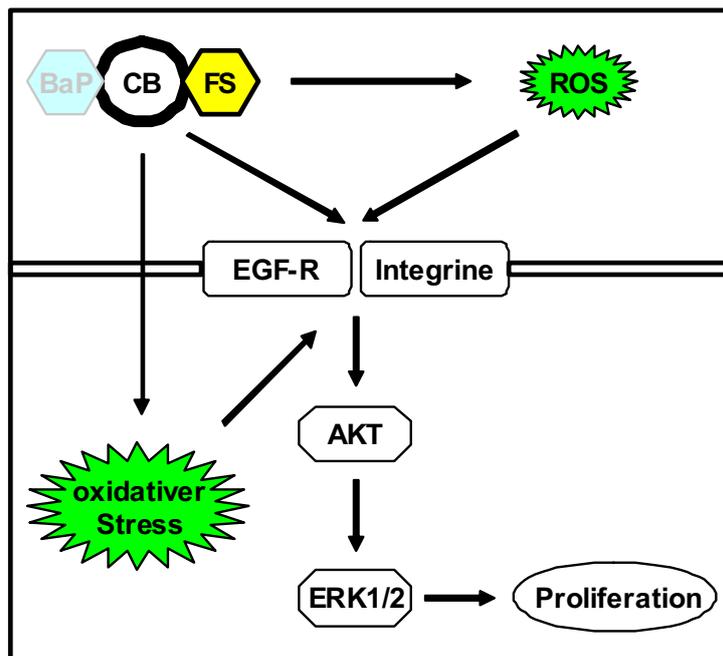
CB und FS sind beide in der Lage, die Generierung von extra- und intrazelluläre ROS zu induzieren. Dabei lässt sich die CB-abhängige intrazelluläre ROS-Induktion durch FS verstärken. Die Aktivierung von AKT und ERK1/2 steht sowohl mit extra- als auch mit intrazellulären ROS in Verbindung. Die Korrelation zwischen dem induzierten oxidativen Stress und der AKT- und ERK1/2-Aktivierung ist somit gegeben, und wird im Rahmen der partikelinduzierten Signaltransduktion in Lungenepithelzellen erstmalig gezeigt.

Sowohl die CB- als auch FS-induzierte Aktivierung von AKT und ERK1/2 verläuft auf der Ebene von Zelloberflächen-Rezeptoren über einen gemeinsamen EGF-R-vermittelten Weg. Dagegen scheint die Beteiligung von  $\beta$ 1-Integrinen spezifisch für die CB-induzierte Signaltransduktion zu sein.

Die hier dargelegten Befunde lassen sich zu einem Schema zusammenfassen (Abb. 4.1), das mit früheren Daten und dem heute akzeptierten hypothetischen Modell zur Mechanismus partikeltoxischer Effekte im Wesentlichen übereinstimmt (Albrecht *et al.* 2004; Donaldson *et al.* 2005). Demnach stellen partikelinduzierte ROS und oxidativen Stress initiale Ereignisse dar, die zur Aktivierung eines EGF-R- und Integrin-vermittelten proliferativen Signalweges über AKT und ERK1/2 führt. Dabei werden mögliche und noch nicht nachgewiesene Interaktionen zwischen den Rezeptoren nicht ausgeschlossen, ebenso wie direkte Partikel-Rezeptor-Interaktionen insbesondere im Kontext der Integrin-vermittelten Signaltransduktion.

Die Beteiligung von Transmembran-Rezeptoren als zentrale Vermittlungsstelle partikelabhängiger Effekte deutet auf die besondere Bedeutung der Vorgänge, die auf der Ebene der Zellmembran stattfinden, hin. Weiterführende Studien sollen zur Aufklärung der hierbei relevanten molekularen Mechanismen helfen, um die kausale Verbindung zur partikelinduzierten Signaltransduktion herzustellen. Hierzu dienen Untersuchungen über mögliche partikelbedingte Einflüsse u. a. auf die Zusammensetzung und (Mikro-) Struktur der Membran sowie Membran-assoziierte Signalproteine.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Toxizität verbrennungsgenerierter Partikel in Zellen des Lungenepithels. Die Arbeit liefert zugleich einen weiteren Hinweis auf die herausragende Bedeutung der Größe und Zusammensetzung als Partikel-Parameter bei der Induktion toxikologisch relevanter Effekte im Rahmen der menschlichen Exposition mit "Feinstaub".



**Abb. 1.2** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten. CB-Partikel und FS, nicht aber BaP, induzieren die Aktivierung des AKT/ERK1/2-Signalweges über die Entstehung von ROS sowie oxidativem Stress und unter Vermittlung durch die Zelloberflächen-Rezeptoren EGF-R und Integrine. Für CB gilt spezifisch die Beteiligung von  $\beta$ 1-Integrinen an der partikelabhängigen Induktion von Proliferation (Sydlik *et al.* 2006). Direkte Partikel-Rezeptor-Interaktionen werden nur angenommen (verändert nach Unfried *et al.* 2008).

## 5. Zusammenfassung

Ultrafeine Partikel (UFP) mit einem Durchmesser kleiner als 100 nm gelten aufgrund ihrer Größe und Oberflächeneigenschaften als eine besonders toxische Fraktion von Umweltstaub. UFP entstehen hauptsächlich durch Verbrennungsprozesse und beinhalten biologisch und chemisch reaktive Komponenten von toxikologischer Relevanz: einen ultrafeinen kohlenstoffhaltigen Kern und daran gebundene organische Verbindungen und (Übergangs-) Metalle.

Anhand eines kombinatorischen Systems von Modell-UFP bestehend aus ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (CB), Benzo[a]pyren-beschichteten CB-Partikeln und Eisen-III-Sulfat (FS) wurden in der vorliegenden Arbeit mögliche modulatorische Effekte der Partikelkomponenten untereinander in der Rattenlungenepithel-Zelllinie RLE-6TN untersucht. Im Mittelpunkt stand die für die partikelinduzierte Zellproliferation relevante Signaltransduktion über AKT und ERK1/2.

CB-Partikel induzieren die Aktivierung von AKT und ERK1/2. Partikelgebundenes Benzo[a]pyren hat auf diesen Effekt keinen Einfluss. Dagegen führt die Anwesenheit von FS zu einer Verstärkung der CB-induzierten AKT- und ERK1/2-Aktivierung. FS selbst induziert ebenfalls die Aktivierung beider Signalproteine. Die in UFP befindlichen Übergangsmetalle können somit als Modulatoren der partikelinduzierten Signaltransduktion wirken. Ferner sind CB und FS beide in der Lage, die Generierung von extra- und intrazelluläre ROS zu induzieren. Die CB-abhängige intrazelluläre ROS-Generierung lässt sich durch FS verstärken, und spiegelt damit die beobachteten Signaltransduktionseffekte wider. Inhibitorstudien zeigten, dass die Aktivierung von AKT und ERK1/2 sowohl mit extra- als auch mit intrazellulären ROS in Verbindung steht. Damit ergibt sich die Korrelation zwischen dem partikelinduzierten oxidativen Stress und der AKT- und ERK1/2-Aktivierung. Auf der Ebene der Membranrezeptoren zeigte sich, dass der EGF-Rezeptor einen gemeinsamen Vermittler der CB- und FS-induzierten Effekte bildet. Die Beteiligung von  $\beta$ 1-Integrinen scheint dagegen eine Spezifität für die CB-induzierte Signaltransduktion zu besitzen.

Die Arbeit zeigt also, dass partikelinduzierte ROS und oxidativer Stress initiale molekulare Ereignisse darstellen, die zur Aktivierung eines EGF-R- und Integrin-vermittelten proliferativen Signalweges über AKT und ERK1/2 führt.

## 6. Summary

Ultrafine particles (UFP) with a diameter smaller than 100 nm are regarded as a particularly toxic fraction of environmental particulate matter due to their size and surface characteristics. UFP are mainly generated through combustion processes, and contain biologically and chemically reactive components of toxicological relevance: an ultrafine carbonaceous core, organic compounds and (transition) metals bound to it.

By means of a combinatoric system of model UFP consisting of ultrafine carbon particles (CB), benzo[a]pyrene-coated CB particles, and iron (III) sulfate, possible modulatoric effects of particle components among themselves were investigated in the rat lung epithelial cell line RLE-6TN. This study focussed on signaling events involving AKT and the MAP-Kinases ERK1/2, which are relevant for particle-induced cell proliferation.

CB particles induce activation of AKT and ERK1/2. Particle-bound benzo[a]pyrene has no influence on this effect. In contrast, the presence of FS leads to an enhancement of CB-induced AKT and ERK1/2 activation. FS alone likewise induces activation of both signal proteins. Hence, transition metals contained in UFP may act als modulators of particle-induced signal transduction. Furthermore, CB and FS are both able to induce extra- and intracellular ROS. CB-dependent intracellular ROS formation can be enhanced by FS, reflecting with it the observed signal transduction effects. Inhibitor studies showed that AKT and ERK1/2 activation is related to both extra- and intracellular ROS. Thus indicating the correlation between particle-induced oxidative stress and activation of AKT and ERK1/2. On the level of cell membrane receptors, the EGF receptor showed to be a common mediator of CB- and FS-induced effects, whereas involvement of  $\beta$ 1-integrins seems to be specific for CB-induced signal transduction.

This work shows that particle-induced ROS and oxidative Stress constitute initial molecular events leading to activation of an EGF receptor and integrin-mediated proliferative signaling pathway via AKT and ERK1/2.

## Literatur

22.BImSchV. Zweiundzwanzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes. 2002

Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H, Klotz LO (2003), Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43 - Role of glutathione and tyrosine phosphatases, *Journal of Biological Chemistry* 278: 38360-38367

Abraham E (2005), Akt/protein kinase B, *Critical Care Medicine* 33: S420-S422

Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004), Image Processing with ImageJ, *Biophotonics International* 11-7: 36-42

Albrecht C, Borm PJA, Adolf B, Timblin CR, Mossman BT (2002), In vitro and in vivo activation of extracellular signal-regulated kinases by coal dusts and quartz, *Toxicology and Applied Pharmacology* 184: 37-45

Albrecht C, Borm PJA, Unfried K (2004), Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 553: 23-35

Alenghat FJ, Ingber DE (2002), Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins, *Sci.STKE*. 2002: E6

Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Nemmar A, Nemery B (2007), Particulate matter in the environment: pulmonary and cardiovascular effects, *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 13: 98-106

Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S, Aubier M, Ogier-Denis E, Boczkowski J (2007), Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NADP(H) oxidase/NOX4 redox-dependent mechanism, *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 293: L170-L181

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliani RL (1998), Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins,

immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins, *Pharmacological Reviews* 50: 197-263

Aplin AE, Juliano RL (1999), Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway, *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 5): 695-706

Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, Schwegler-Berry D, Pacurari M, Porter D, Shi X, Vallyathan V, Castranova V, Flynn DC (2009), Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling, *Part Fibre.Toxicol.* 6: 1

Ashby E (1987), The Big Smoke - A History of Air-Pollution in London Since Medieval Times - Brimblecombe,P, *Nature* 326: 551-552

Baan R, Straif K, Grosse Y (2006), Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. (vol 7, pg 295, 2006), *Lancet Oncology* 7: 365

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG (1997), Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation, *J.Biol.Chem.* 272: 217-221

Baeza-Squiban A, Bonvallot V, Boland S, Marano F (1999), Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors, *Cell Biol.Toxicol.* 15: 375-380

Bair WJ (1995), The Icrp Human Respiratory-Tract Model for Radiological Protection, *Radiation Protection Dosimetry* 60: 307-310

Ball JC, Straccia AM, Young WC, Aust AE (2000), The formation of reactive oxygen species catalyzed by neutral, aqueous extracts of NIST ambient particulate matter and diesel engine particles, *Journal of the Air & Waste Management Association* 50: 1897-1903

Bansal RC, Wang MJ, Donnet JB (1993), Carbon black: Science and technology, 2nd. ed., New York: Marcel Dekker, 482 pp.

Barchowsky A, O'Hara KA (2003), Metal-induced cell signaling and gene activation in lung diseases, *Free Radic.Biol.Med.* 34: 1130-1135

Barlow PG, Clouter-Baker A, Donaldson K, Maccallum J, Stone V (2005), Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages, *Part Fibre Toxicol.* 2: 11

Barthel A, Klotz LO (2005), Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress, *Biological Chemistry* 386: 207-216

Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M (1983), Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils - A Graded Response to Membrane Stimulation, *Journal of Immunology* 130: 1910-1917

Bauer H, Kasper-Giebl A, Loflund M, Giebl H, Hitzemberger R, Zibuschka F, Puxbaum H (2002), The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmospheric Research* 64: 109-119

Beaucage G, Rane S, Schaefer DW, Long G, Fischer D (1999), Morphology of polyethylene-carbon black composites, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* 37: 1105-1119

Berken A, Abel J, Unfried K (2003), beta 1-integrin mediates asbestos-induced phosphorylation of AKT and ERK1/2 in a rat pleural mesothelial cell line, *Oncogene* 22: 8524-8528

BeruBe K, Balharry D, Sexton K, Koshy L, Jones T (2007), Combustion-derived nanoparticles: Mechanisms of pulmonary toxicity, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34: 1044-1050

Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS, Miranti CK (2004), Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells, *Molecular and Cellular Biology* 24: 8586-8599

Blanchet S, Ramgolam K, Baulig A, Marano F, Baeza-Squiban A (2004), Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30: 421-427

Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R, Marano F (2001), Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25: 515-521

Borm PJA, Kelly F, Kunzli N, Schins RPF, Donaldson K (2007), Oxidant generation by particulate matter: from biologically effective dose to a promising, novel metric, *Occupational and Environmental Medicine* 64: 73-74

Brand P, Gebhart J, Below M, Georgi B, Heyder J (1991), Characterization of Environmental Aerosols on Heligoland Island, *Atmospheric Environment Part A-General Topics* 25: 581-585

Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA (2004), Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts, *Trends in Biochemical Sciences* 29: 233-242

Bridges AJ, Zhou H, Cody DR, Rewcastle GW, McMichael A, Showalter HD, Fry DW, Kraker AJ, Denny WA (1996), Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor, *J.Med.Chem.* 39: 267-276

Brits E, Schoeters G, Verschaeve L (2004), Genotoxicity of PM10 and extracted organics collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium, *Environmental Research* 96: 109-118

Brook RD, Brook JR, Urch B, Vincent R, Rajagopalan S, Silverman F (2002), Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults, *Circulation* 105: 1534-1536

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Jr., Tager I (2004), Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association, *Circulation* 109: 2655-2671

Brown JS, Zeman KL, Bennett WD (2002), Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166: 1240-1247

Brunekreef B, Holgate ST (2002), Air pollution and health, *Lancet* 360: 1233-1242

Burnett RT, Brook J, Dann T, Delocla C, Philips O, Cakmak S, Vincent R, Goldberg MS, Krewski D (2000), Association between particulate- and gas-phase components of urban air pollution and daily mortality in eight Canadian cities, *Inhalation Toxicology* 12: 15-39

Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB (1997), Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent, *Toxicology and Applied Pharmacology* 146: 180-188

Cassee FR, Fokkens PHB, Leseman DLAC, Bloemen HJT, Boere AJF (2003), Respiratory allergy and inflammation due to ambient particles (RAIAP) - collection of particulate matter samples from 5 European sites. RIVM rapport 863001001

Chen H, Huang XN, Stewart AF, Sepulveda JL (2004), Gene expression changes associated with fibronectin-induced cardiac myocyte hypertrophy, *Physiol Genomics* 18: 273-283

Cheresh DA (1987), Human-Endothelial Cells Synthesize and Express An Arg-Gly-Asp-Directed Adhesion Receptor Involved in Attachment to Fibrinogen and Vonwillebrand-Factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 6471-6475

Chin BY, Choi ME, Burdick MD, Strieter RM, Risby TH, Choi AM (1998), Induction of apoptosis by particulate matter: role of TNF-alpha and MAPK, *Am.J.Physiol* 275: L942-L949

Chin BY, Trush MA, Choi AM, Risby TH (2003), Transcriptional regulation of the HO-1 gene in cultured macrophages exposed to model airborne particulate matter, *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 284: L473-L480

Cobb MH, Goldsmith EJ (1995), How Map Kinases Are Regulated, *Journal of Biological Chemistry* 270: 14843-14846

Cruet-Hennequart S, Maubant S, Luis J, Gauduchon P, Staedel C, Dedhar S (2003),  $\alpha(v)$  integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells, *Oncogene* 22: 1688-1702

Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, Burnett RT (2004), Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 303-306

Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998), Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 95: 11211-11216

Delfino RJ, Sioutas C, Malik S (2005), Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health, *Environ Health Perspect.* 113: 934-946

Deshpande A, Narayanan PK, Lehnert BE (2002), Silica-induced generation of extracellular factor(s) increases reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells, *Toxicol.Sci.* 67: 275-283

DeYulia GJ, Jr., Carcamo JM (2005), EGF receptor-ligand interaction generates extracellular hydrogen peroxide that inhibits EGFR-associated protein tyrosine phosphatases, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 334: 38-42

Doble BW, Woodgett JR (2003), GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase, *J.Cell Sci.* 116: 1175-1186

Donaldson K, Gilmour MI, MacNee W (2000), Asthma and PM10, *Respir.Res.* 1: 12-15

Donaldson K, Tran CL (2002), Inflammation caused by particles and fibers, *Inhalation Toxicology* 14: 5-27

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

Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W (2003), Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10), *Free Radic.Biol.Med.* 34: 1369-1382

Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V (2005), Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure, *Part Fibre.Toxicol.* 2: 10

Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, Mcgee JK, Ghio AJ, Costa DL (1997), Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury, *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50: 285-305

Dreher KL (2000), Particulate matter physicochemistry and toxicology: In search of causality - A critical perspective, *Inhalation Toxicology* 12: 45-57

Driscoll KE, Carter JM, Iype PT, Kumari HL, Crosby LL, Aardema MJ, Isfort RJ, Cody D, Chestnut MH, Burns JL, Leboeuf RA (1995), Establishment of Immortalized Alveolar Type-II Epithelial-Cell Lines from Adult-Rats, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 31: 516-527

Driscoll KE (1996), Role of inflammation in the development of rat lung tumors in response to chronic particle exposure, *Inhalation Toxicology* 8: 139-153

Duffin R, Tran CL, Clouter A, Brown DM, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2002), The Importance of Surface Area and Specific Reactivity in the Acute Pulmonary Inflammatory Response to Particles, *Annals of Occupational Hygiene* 46: 242-245

Dye JA, Lehmann JR, Mcgee JK, Winsett DW, Ledbetter AD, Everitt JI, Ghio AJ, Costa DL (2001), Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: Coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents, *Environmental Health Perspectives* 109: 395-403

Eliceiri BP (2001), Integrin and growth factor receptor crosstalk, *Circ.Res.* 89: 1104-1110

Epp O, Ladenstein R, Wendel A (1983), The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione-Peroxidase at 0.2-Nm Resolution, *European Journal of Biochemistry* 133: 51-69

Europäische Union. Richtlinie 1999/30/EG des Rates vom 22. April 1999 über Grenzwerte für Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid und Stickstoffoxide, Partikel und Blei in der Luft. 1999

Ferin J, Oberdorster G, Penney DP, Soderholm SC, Gelein R, Piper HC (1990), Increased Pulmonary Toxicity of Ultrafine Particles .1. Particle Clearance, Translocation, Morphology, *Journal of Aerosol Science* 21: 381-384

Fickova M (2002), Structure and activation of EGF receptor: minireview, *Endocr.Regul.* 36: 87-93

Frampton MW, Ghio AJ, Samet JM, Carson JL, Carter JD, Devlin RB (1999), Effects of aqueous extracts of PM10 filters from the Utah Valley on human airway epithelial cells, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 277: L960-L967

Fridovich I, Freeman B (1986), Antioxidant defenses in the lung, *Annu.Rev.Physiol* 48: 693-702

Frisch SM, Francis H (1994), Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, *J.Cell Biol.* 124: 619-626

Fubini B (1997), Surface reactivity in the pathogenic response to particulates, *Environmental Health Perspectives* 105: 1013-1020

Gao A, Liu B, Shi X, Jia X, Ye M, Jiao S, You B, Huang C (2007), Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/p70S6K/AP-1 signaling pathway mediated benzo(a)pyrene-induced cell cycle alternation via cell cycle regulatory proteins in human embryo lung fibroblasts, *Toxicol.Lett.* 170: 30-41

Garcon G, Gosset P, Garry S, Marez T, Hannotiaux MH, Shirali P (2001), Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles, *Toxicology Letters* 121: 107-117

Gardiner K, van Tongeren M, Harrington M (2001), Respiratory health effects from exposure to carbon black: results of the phase 2 and 3 cross sectional studies in the European carbon black manufacturing industry, *Occupational and Environmental Medicine* 58: 496-503

Gary DS, Milhavet O, Camandola S, Mattson MP (2003), Essential role for integrin linked kinase in Akt-mediated integrin survival signaling in hippocampal neurons, *Journal of Neurochemistry* 84: 878-890

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Hof VI, Heyder J, Gehr P (2005), Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells, *Environmental Health Perspectives* 113: 1555-1560

Giancotti FG, Ruoslahti E (1999), Transduction - Integrin signaling, *Science* 285: 1028-1032

Gilmour PS, Brown DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K (1996), Adverse health effects of PM(10) particles: Involvement of iron in generation of hydroxyl radical, *Occupational and Environmental Medicine* 53: 817-822

Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, Vickers MA, Drost EM, Ford I, Karg E, Mossa C, Schroepel A, Ferron GA, Heyder J, Greaves M, MacNee W, Donaldson K (2004), Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles, *Toxicology and Applied Pharmacology* 195: 35-44

Gwinn MR, Vallyathan V (2006), Nanoparticles: Health effects - Pros and cons, *Environmental Health Perspectives* 114: 1818-1825

Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Jibiki I, Takizawa H, Kudoh S, Horie T (2000), Diesel exhaust particles activate p38 MAP kinase to produce interleukin 8 and RANTES by human bronchial epithelial cells and N-acetylcysteine attenuates p38 MAP kinase activation, *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 161: 280-285

Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995), Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and 2 Different Strains of Mice to Diesel-Engine Exhaust, Carbon-Black, and Titanium-Dioxide, *Inhalation Toxicology* 7: 533-556

Hetland RB, Refsnes M, Cassee FR, Lag M, Dybing E, Schwarze PE (2005), Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: Relation to size, city, season and metal content, *Toxicology Letters* 158: S80-S81

Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV (2004), Nanoparticles - known and unknown health risks, *J.Nanobiotechnology*. 2: 12

Hughes LS, Cass GR, Gone J, Ames M, Olmez I (1998), Physical and chemical characterization of atmospheric ultrafine particles in the Los Angeles area, *Environmental Science & Technology* 32: 1153-1161

Hynes RO (1992), Integrins - Versatility, Modulation, and Signaling in Cell-Adhesion, *Cell* 69: 11-25

Jiao S, Liu B, Gao A, Ye M, Jia X, Zhang F, Liu H, Shi X, Huang C (2008), Benzo(a)pyrene-caused increased G1-S transition requires the activation of c-Jun through p53-dependent PI-3K/Akt/ERK pathway in human embryo lung fibroblasts, *Toxicol.Lett.* 178: 167-175

Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Duffin R, Drost EM, Hay RT, Donaldson K, MacNee W (2000), Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 166: 101-110

Johnson GL, Lapadat R (2002), Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science* 298: 1911-1912

Kawasaki S, Takizawa H, Takami K, Desaki M, Okazaki H, Kasama T, Kobayashi K, Yamamoto K, Nakahara K, Tanaka M, Sagai M, Ohtoshi T (2001), Benzene-extracted components are important for the major activity of diesel exhaust particles: effect on interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells, *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 24: 419-426

- Kim E, Hopke PK, Pinto JP, Wilson WE (2005), Spatial variability of fine particle mass, components, and source contributions during the regional air pollution study in St. Louis, *Environmental Science & Technology* 39: 4172-4179
- Kim YM, Reed W, Wu W, Bromberg PA, Graves LM, Samet JM (2006), Zn<sup>2+</sup>-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells, *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 290: L1028-L1035
- King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN, Brugge JS (1997), Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation, *Mol.Cell Biol.* 17: 4406-4418
- Klotz LO (2002), Oxidant-induced signaling: Effects of peroxynitrite and singlet oxygen, *Biological Chemistry* 383: 443-456
- Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF (2004), Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms, *International Journal of Cancer* 109: 799-809
- Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P (1996), Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents, *EMBO J.* 15: 5314-5325
- Konaka R, Kasahara E, Dunlap WC, Yamamoto Y, Chien KC, Inoue M (1999), Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion, *Free Radical Biology and Medicine* 27: 294-300
- Kozikowski AP, Sun HY, Brognard J, Dennis PA (2003), Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase Akt, *Journal of the American Chemical Society* 125: 1144-1145
- Kreyling WG, Scheuch G (2000), Clearance of particles deposited in the lung. In: Gehr P. Heyder J ed. Particle-Lung Interactions. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, pp. 323-376.
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Moller W (2006), Health implications of nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research* 8: 543-562

Laden F, Neas LM, Dockery DW, Schwartz J (2000), Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six US cities, *Environmental Health Perspectives* 108: 941-947

Laemmli UK (1970), Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4, *Nature* 227: 680-&

Lafrenie RM, Yamada KM (1996), Integrin-dependent signal transduction, *Journal of Cellular Biochemistry* 61: 543-553

Lahl U, Steven W (2005), Feinstaub - eine gesundheitspolitische Herausforderung, *Pneumologie* 59: 704-714

Lambeth JD (2007), Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy, *Free Radic.Biol.Med.* 43: 332-347

Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999), Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage, *Current Opinion in Cell Biology* 11: 219-225

Li N, Kaplan R, Gujuluva S, Alam J, Nel A (2000), Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones is mediated through antioxidant responsive elements in that gene enhancer, *Faseb Journal* 14: A1065

Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang MY, Oberley T, Froines J, Nel A (2003), Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage, *Environmental Health Perspectives* 111: 455-460

Li N, Xia T, Nel AE (2008), The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles, *Free Radical Biology and Medicine* 44: 1689-1699

Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W (1996), Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM(10)) in vivo and in vitro, *Thorax* 51: 1216-1222

Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W (1997), In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10), *Environmental Health Perspectives* 105: 1279-1283

Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W, Donaldson K (1999), Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats, *Inhalation Toxicology* 11: 709-731

Li Y, Trush MA (1998), Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 253: 295-299

Liu W, Ernst JD, Broaddus VC (2000), Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells, *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23: 371-378

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951), Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275

Marano F, Boland S, Bonvallot V, Baulig A, Baeza-Squiban A (2002), Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles, *Cell Biology and Toxicology* 18: 315-320

Matsuo M, Shimada T, Uenishi R, Sasaki N, Sagai M (2003), Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26: 438-447

Mauderly JL, Snipes MB, Barr EB, Belinsky SA, Bond JA, Brooks AL, Chang IY, Cheng YS, Gillett NA, Griffith WC, . (1994), Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats. Part I: Neoplastic and nonneoplastic lung lesions, *Res.Rep.Health Eff.Inst.* 1-75

McMurry PH, Shepherd M, Vickery JS (2004), Particulate matter science for policy makers: a NARSTO assessment. Cambridge, Cambridge University Press

Meister A, Anderson ME (1983), Glutathione, *Annu.Rev.Biochem.* 52: 711-760

Molinelli AR, Madden MC, Mcgee JK, Stonehuerner JG, Ghio AJ (2002), Effect of metal removal on the toxicity of airborne particulate matter from the Utah Valley, *Inhalation Toxicology* 14: 1069-1086

Monn C, Becker S (1999), Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM<sub>2.5</sub>) and coarse particles (PM<sub>10-2.5</sub>) in outdoor and indoor air, *Toxicology and Applied Pharmacology* 155: 245-252

Morgenstern V, Zutavern A, Cyrus J, Brockow I, Koletzko S, Kramer U, Behrendt H, Herbarth O, von Berg A, Bauer CP, Wichmann HE, Heinrich J (2008), Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177: 1331-1337

Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, Tarone G, Defilippi P (1998), Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival, *Embo Journal* 17: 6622-6632

Mossman BT, Borm PJ, Castranova V, Costa DL, Donaldson K, Kleeberger SR (2007), Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases, *Part Fibre.Toxicol.* 4: 4

Mroz RM, Schins RPF, Li H, Jimenez LA, Drost EM, Holownia A, MacNee W, Donaldson K (2008), Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways, *European Respiratory Journal* 31: 241-251

Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006), Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science* 311: 622-627

Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N (2001), The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress, *Curr.Opin.Pulm.Med.* 7: 20-26

Nemery B, Hoet PHM, Nemmar A (2001), The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster, *Lancet* 357: 704-708

NRC (2004) Research priorities for airborne particulate matter. IV. Continuing research progress. National Academy Press, Washington, DC

O'Neill MS, Veves A, Zanobetti A, Sarnat JA, Gold DR, Economides PA, Horton ES, Schwartz J (2005), Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution - Associated impairment in vascular reactivity and endothelial function, *Circulation* 111: 2913-2920

Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J (1992), Role of the Alveolar Macrophage in Lung Injury - Studies with Ultrafine Particles, *Environmental Health Perspectives* 97: 193-199

Oberdorster G, Gelein RM, Ferin J, Weiss B (1995), Association of Particulate Air-Pollution and Acute Mortality - Involvement of Ultrafine Particles, *Inhalation Toxicology* 7: 111-124

Oberdorster G (2001), Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles, *International Archives of Occupational and Environmental Health* 74: 1-8

Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J (2005), Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environmental Health Perspectives* 113: 823-839

Oberdorster G, Stone V, Donaldson K (2007), Toxicology of nanoparticles: A historical perspective, *Nanotoxicology* 1: 2-25

Ormstad H, Johansen BV, Gaarder PI (1998), Airborne house dust particles and diesel exhaust particles as allergen carriers, *Clinical and Experimental Allergy* 28: 702-708

Park JH, Spiegelman DL, Burge HA, Gold DR, Chew GL, Milton DK (2000), Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home, *Environmental Health Perspectives* 108: 1023-1028

Pekkanen J, Timonen KL, Ruuskanen J, Reponen A, Mirme A (1997), Effects of ultrafine and fine particles in urban air on peak expiratory flow among children with asthmatic symptoms, *Environmental Research* 74: 24-33

Pekkanen J, Peters A, Hoek G, Tiittanen P, Brunekreef B, de Hartog J, Heinrich J, Ibaldo-Mulli A, Kreyling WG, Lanki T, Timonen KL, Vanninen E (2002), Particulate air

pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease - The exposure and risk assessment for fine and ultrafine particles in ambient air (ULTRA) study, *Circulation* 106: 933-938

Peng RD, Dominici F, Pastor-Barriuso R, Zeger SL, Samet JM (2005), Seasonal analyses of air pollution and mortality in 100 US cities, *American Journal of Epidemiology* 161: 585-594

Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997), Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155: 1376-1383

Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA (2001), Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction, *Circulation* 103: 2810-2815

Peters A, von Klot S, Heier M, Trentinaglia I, Hormann A, Wichmann HE, Lowel H (2004), Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction, *New England Journal of Medicine* 351: 1721-1730

Pope CA (2000), Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: Biologic mechanisms and who's at risk?, *Environmental Health Perspectives* 108: 713-723

Pope CA, III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002), Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution, *JAMA* 287: 1132-1141

Putaud JP, Raes F, Van Dingenen R, Brüggemann E, Facchini MC, Decesari S, Fuzzi S, Gehrig R, Hüglin C, Laj P, Lorbeer G, Maenhaut W, Mihalopoulos N, Müller K, Querol X, Rodriguez S, Schneider J, Spindler G, ten Brink H, Tørseth K, Wiedensohler A (2004), European aerosol phenomenology-2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe, *Atmospheric Environment* 38: 2579-2595

Rae T (1977), Tolerance of Mouse Macrophages Invitro to Barium-Sulfate Used in Orthopedic Bone Cement, *Journal of Biomedical Materials Research* 11: 839-846

Rasband, W.S. (1997-2008), ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Renwick LC, Donaldson K, Clouter A (2001), Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles, *Toxicology and Applied Pharmacology* 172: 119-127

Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004), Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types, *Occupational and Environmental Medicine* 61: 442-447

Rhee SG (1999), Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger, *Experimental and Molecular Medicine* 31: 53-59

Rice TM, Clarke RW, Godleski JJ, Al Mutairi E, Jiang NF, Hauser R, Paulauskis JD (2001), Differential ability of transition metals to induce pulmonary inflammation, *Toxicology and Applied Pharmacology* 177: 46-53

Roemer W, Hoek G, Brunekreef B, Clench-Aas J, Forsberg B, Pekkanen J, Schutz A (2000), PM10 elemental composition and acute respiratory health effects in European children (PEACE project), *European Respiratory Journal* 15: 553-559

Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1987), New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *Science* 238: 491-497

Sadowska AM, Manuel YK, De Backer WA (2007), Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review, *Pulm.Pharmacol.Ther.* 20: 9-22

Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg PA, Reed W (1998), Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals, *Am.J.Physiol* 275: L551-L558

Sandhu H, Olbruck H, Abel J, Unfried K (2000), Differential display analysis of fiver-induced carcinogenesis in rat: Clue for involvement of integrin-mediated signal transduction, *Inhalation Toxicology* 12: 337-343

Sandhu H, Dehnen W, Roller M, Abel J, Unfried K (2000), mRNA expression patterns in different stages of asbestos-induced carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis* 21: 1023-1029

Schaumann F, Borm PJA, Herbrich A, Knoch J, Pitz M, Schins RPF, Luettig B, Hohlfeld JM, Heinrich J, Krug N (2004), Metal-rich ambient particles (Particulate Matter(2.5)) cause airway inflammation in healthy subjects, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170: 898-903

Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Kramer U (2005), Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women, *Respir.Res.* 6: 152

Schulz H, Harder V, Ibald-Mulli A, Khandoga A, Koenig W, Krombach F, Radykewicz R, Stampfl A, Thorand B, Peters A (2005), Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles, *J.Aerosol Med.* 18: 1-22

Schwartz J, Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Weiss S, Kelsey K (2005), Glutathione-S-transferase M1, obesity, statins, and autonomic effects of particles: gene-by-drug-by-environment interaction, *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172: 1529-1533

Schwarze PE, Ovreivik J, Lag M, Refsnes M, Nafstad P, Hetland RB, Dybing E (2006), Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies, *Hum.Exp.Toxicol.* 25: 559-579

Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D (1995), Particulate Air-Pollution and Acute Health-Effects, *Lancet* 345: 176-178

Seidman MD, Quirk WS, Shirwany NA (1999), Reactive oxygen metabolites, antioxidants and head and neck cancer, *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* 21: 467-479

Shen TL, Guan JL (2001), Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts, *Febs Letters* 499: 176-181

Shi JP, Evans DE, Khan AA, Harrison RM (2001), Sources and concentration of nanoparticles (< 10 nm diameter) in the urban atmosphere, *Atmospheric Environment* 35: 1193-1202

Shi TM, Schins RPF, Knaapen AM, Kuhlbusch T, Pitz M, Heinrich J, Borm PJA (2003), Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition, *Journal of Environmental Monitoring* 5: 550-556

Shi TM, Duffin R, Borm PJA, Li H, Weishaupt C, Schins RPF (2006), Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations, *Environmental Research* 101: 18-24

Shukla A, Timblin C, BeruBe K, Gordon T, McKinney W, Driscoll K, Vacek P, Mossman BT (2000), Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappa B-related genes and oxidant-dependent NF-kappa B activation in vitro, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 23: 182-187

Shukla A, Timblin CR, Hubbard AK, Bravman J, Mossman BT (2001), Silica-induced activation of c-Jun-NH2-terminal amino kinases, protracted expression of the activator protein-1 proto-oncogene, fra-1, and S-phase alterations are mediated via oxidative stress, *Cancer Research* 61: 1791-1795

Shukla A, Stern M, Lounsbury KM, Flanders T, Mossman BT (2003), Asbestos-induced apoptosis is protein kinase C delta-dependent, *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 29: 198-205

Smith JW, Vestal DJ, Irwin SV, Burke TA, Cheresh DA (1990), Purification and Functional-Characterization of Integrin-Alpha-V-Beta-5 - An Adhesion Receptor for Vitronectin, *Journal of Biological Chemistry* 265: 11008-11013

Smith KR, Aust AE (1997), Mobilization of iron from urban particulates leads to generation of reactive oxygen species in vitro and induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells, *Chemical Research in Toxicology* 10: 828-834

Sorensen M, Daneshvar B, Hansen M, Dragsted LO, Hertel O, Knudsen L, Loft S (2003), Personal PM<sub>2.5</sub> exposure and markers of oxidative stress in blood, *Environmental Health Perspectives* 111: 161-165

Soukup JM, Becker S (2001), Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin, *Toxicology and Applied Pharmacology* 171: 20-26

Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA (2001), Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter, *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1132-1138

Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, Nathan CF (1991), Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleidonium and its analogs, *FASEB J.* 5: 98-103

Sydlik U, Bierhals K, Soufi M, Abel J, Schins RPF, Unfried K (2006), Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 291: L725-L733

Tal TL, Graves LM, Silbajoris R, Bromberg PA, Wu W, Samet JM (2006), Inhibition of protein tyrosine phosphatase activity mediates epidermal growth factor receptor signaling in human airway epithelial cells exposed to Zn<sup>2+</sup>, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 214: 16-23

Tamaoki J, Isono K, Takeyama K, Tagaya E, Nakata J, Nagai A (2004), Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287: L1127-L1133

Tankersley CG, Campen M, Bierman A, Flanders SE, Broman KW, Rabold R (2004), Particle effects on heart-rate regulation in senescent mice, *Inhalation Toxicology* 16: 381-390

Timblin CR, Shukla A, Berlanger I, Berube KA, Churg A, Mossman BT (2002), Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and

proliferation in alveolar epithelial cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 179: 98-104

Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K (2000), Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance, *Inhalation Toxicology* 12: 1113-1126

Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St Arnaud R, Dedhar S (2003), Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation, *Journal of Biological Chemistry* 278: 22374-22378

UBA (Umweltbundesamt) (2005), Hintergrundpapier zum Thema Staub/Feinstaub (PM)

Unfried K, Albrecht C, Klotz LO, Von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF (2007), Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms, *Nanotoxicology* 1: 52-71

Unfried K, Sydlik U, Bierhals K, Weissenberg A, Abel J (2008), Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294: L358-L367

Urch B, Brook JR, Wasserstein D, Brook RD, Rajagopalan S, Corey P, Silverman F (2004), Relative contributions of PM<sub>2.5</sub> chemical constituents to acute arterial vasoconstriction in humans, *Inhalation Toxicology* 16: 345-352

USEPA (US Environmental Protection Agency) (1987), Proposed revisions to the nation's ambient air quality standards for particulate matter.

USEPA (US Environmental Protection Agency) (1997), National ambient air quality standards for particulate matter, Part KK.

USEPA (US Environmental Protection Agency) (2004), Air quality criteria for particulate matter.

Valberg PA, Watson AY (1996), Lung cancer rates in carbon-black workers are discordant with predictions from rat bioassay data, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24: 155-170

van Tongeren MJA, Gardiner K, Rossiter CE, Beach J, Harber P, Harrington MJ (2002), Longitudinal analyses of chest radiographs from the European Carbon Black Respiratory Morbidity Study, *European Respiratory Journal* 20: 417-425

WHO (2000), Air quality guidelines for Europe, 2nd. ed., World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen.

WHO (2006), Air Quality Guidelines. Global Update 2005, World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen.

Wichmann HE, Peters A (2000), Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 358: 2751-2768

Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002), Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro, *Toxicology and Applied Pharmacology* 184: 172-179

Wilson MR, Foucaud L, Barlow PG, Hutchison GR, Sales J, Simpson RJ, Stone V (2007), Nanoparticle interactions with zinc and iron: implications for toxicology and inflammation, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 225: 80-89

Woodgett JR (2005), Recent advances in the protein kinase B signaling pathway, *Current Opinion in Cell Biology* 17: 150-157

Wu W, Graves LM, Jaspers I, Devlin RB, Reed W, Samet JM (1999), Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals, *Am.J.Physiol* 277: L924-L931

Wu W, Jaspers I, Zhang W, Graves LM, Samet JM (2002), Role of Ras in metal-induced EGF receptor signaling and NF-kappaB activation in human airway epithelial cells, *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 282: L1040-L1048

Wu WD, Samet JM, Ghio AJ, Devlin RB (2001), Activation of the EGF receptor signaling pathway in airway epithelial cells exposed to Utah Valley PM, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 281: L483-L489

Wyler C, Braun-Fahrlander C, Kunzli N, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Perruchoud AP, Leuenberger P, Wuthrich B (2000), Exposure to motor vehicle traffic and allergic sensitization. The Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team, *Epidemiology* 11: 450-456

Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A (2004), Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for ultrafine particle toxicity, *Environmental Health Perspectives* 112: 1347-1358

Xia T, Kovoichich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE (2006), Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm, *Nano Letters* 6: 1794-1807

Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T (2003), Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C-60) as potential medicines: O-2(-center dot) versus O-1(2), *Journal of the American Chemical Society* 125: 12803-12809

Yamanaka I, Koizumi M, Baba T, Yamashita S, Suzuki T, Kudo R (2003), Epidermal growth factor increased the expression of alpha 2 beta 1-integrin and modulated integrin-mediated signaling in human cervical adenocarcinoma cells, *Experimental Cell Research* 286: 165-174

Zhang Q, Kleeberger SR, Reddy SP (2004), DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 286: L427-L436

Zhao XS, Wan Z, Zhu HG, Chen RP (2003), The carcinogenic potential of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 540: 107-117

Zhou YM, Zhong CY, Kennedy IM, Leppert VJ, Pinkerton KE (2003), Oxidative stress and NFkappaB activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 190: 157-169

Zhu YF, Hinds WC, Kim S, Shen S, Sioutas C (2002), Study of ultrafine particles near a major highway with heavy-duty diesel traffic, *Atmospheric Environment* 36: 4323-4335

Zöfel P (1992), Statistik in der Praxis – 3. überarbeitete Auflage, G. Fischer Verlag, Jena

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Josef Abel für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Proksch bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Frau Prof. Dr. Regine Kahl und dem gesamten Graduiertenkolleg 1427 danke ich für die Aufnahme im selbigen und das in den vielen lehrreichen Veranstaltungen vermittelte Wissen in der Toxikologie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Unfried für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten, seine stetige und umfassende Unterstützung und die wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen.

Ich danke ebenfalls der Arbeitsgruppe Partikel-Zell-Interaktionen sowie dem gesamten Arbeitsbereich Molekulare Toxikologie für das schöne Arbeitsklima, fachlichen Rat und Hilfestellung. Dabei danke ich insbesondere Dr. Ulrich Sydlik, Dipl.-Biol. Inka Gallitz und Dipl.-Biol. Henrike Peuschel für die kollegiale Zusammenarbeit und die freundlichen, hilfreichen Gespräche nicht nur wissenschaftlicher Art. Bei Herrn Winfried Brock und ganz besonders Frau Ragnhild Wirth bedanke ich mich für die exzellente technische Assistenz und vor allem die frühmorgendliche Hilfe.

Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern des Instituts für umweltmedizinische Forschung für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit und Hilfestellung in theoretischen wie auch praktischen Fragen, besonders Dr. Roel Schins, Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz und Dr. Bettina Jux.

Ein schöner Dank gilt meiner Schwimmergruppe: Dipl.-Biol. Stefanie Chmill, Dipl.-Biol. Nadine Seifert, Dipl.-Biol. Katja Nehrenheim und Dr. Christine Götz.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie und FreundInnen in Mexiko für ihre moralische Unterstützung, Motivation und Glaube an mich: *Gracias mamá y papá, gracias Herrmann, Carlos y familia, gracias amigos y amigas.*

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und FreundInnen in Deutschland für ihr Interesse und Unterstützung.

Danke Jens, dass du da bist.

## Lebenslauf

Name: Alexander Weissenberg  
Geburtsdatum: 26.02.1976  
Geburtsort: Mexiko-Stadt  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung

09/1982 – 06/1988 Grundschule Escuela Nacional Educativa, Mexiko-Stadt  
09/1988 – 06/1994 Mittlere/Oberschule Escuela Tomás Alva Edison, Mexiko-Stadt  
Abschluss: Bachillerato (mexikanisches Abitur)  
11/1996 Anerkennungsprüfung für deutsche Staatsangehörige mit  
ausländischem Reifezeugnis zum Erwerb der fachgebundenen  
Hochschulzugangsberechtigung

### Studium

10/1997 – 03/2004 Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum  
Abschluss: Diplom, Note "gut"  
Thema der Diplomarbeit: *Redox-Regulation der Chloroplasten-  
Transkription: Einfluss von oxidativem Stress.*  
Angefertigt in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Zellphysiologie und  
Molekularbiologie. Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Link  
Seit 01/2005 Anfertigung der Dissertation am Institut für umweltmedizinische  
Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gGmbH. Arbeitsbereich Molekulare Toxikologie.  
Thema der Dissertation: *Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies  
bei der proliferativen Signaltransduktion ausgelöst durch  
verbrennungsgenerierte ultrafeine Umweltpartikel in Lungen-  
epithelzellen.*  
Betreuer: Prof. Dr. Josef Abel

Seit 12/2006 Kollegiat im DFG-Graduiertenkolleg 1427: *Nahrungsinhaltsstoffe als Signalgeber nukleärer Rezeptoren im Darm.*  
Sprecherin: Prof. Dr. Regine Kahl

### **Berufliche Tätigkeit**

07/2004 – 12/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Zellphysiologie und Molekularbiologie (Prof. Dr. Gerhard.. Link) an der Ruhr-Universität Bochum

Seit 01/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Partikel-Zell-Interaktionen (Dr. Klaus Unfried) im Arbeitsbereich Molekulare Toxikologie (Prof. Dr. Josef Abel) am Institut für umwelt-medizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

Bochum, den 02.04.2009

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Dissertation habe ich in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Alexander Weissenberg

Düsseldorf, den 02.04.2009