





# **Die Rolle von Membranstrukturen bei der durch ultrafeine Partikel induzierten proliferativen Signaltransduktion in Lungenepithelzellen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Henrike Peuschel**  
aus Halle (Saale)

Düsseldorf, September 2010

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Klaus Unfried  
Koreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

*Alles wird gut!*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Biologische Membranen	1
1.1.1 Lipidmikrodomänen (Lipid Rafts) in der Membran	3
1.1.2 Die Rolle von Lipid Rafts bei Signaltransduktionsprozessen	6
1.2 Signaltransduktion als Reaktion auf Umwelteinflüsse	9
1.2.1 Ultrafeine Partikel	10
1.2.2 Partikelinduzierte Signaltransduktionsprozesse	13
1.2.3 Modell zum molekularen Mechanismus UFP-induzierter Effekte	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Inhibitoren	23
2.1.4 Stimulatoren und andere Substanzen	24
2.1.5 Antikörper	25
2.1.6 Zelllinie	26
2.1.7 Partikel	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellbiologische Methoden	27
2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie RLE-6TN	27
2.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen	27
2.2.1.3 Belastung der Zellen mit Partikeln und Inhibitoren	28
2.2.2 Transfektion von siRNA	29
2.2.3 Zytotoxizitätsassay	30
2.2.4 Isolierung von Zellmembranmikrodomänen (Lipid Rafts)	31
2.2.5 Dot Blot zum Nachweis von Gangliosid G <sub>M</sub> 1	32
2.2.6 Proteinbiochemische Methoden	33

2.2.6.1	Zelllyse und Proteinextraktion	33
2.2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.6.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.6.4	Western Blot Transfer	36
2.2.6.5	Immunologischer Proteinnachweis	36
2.2.6.6	Densitometrische Auswertung	37
2.2.7	Statistik	37
2.2.8	Abbildungen	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Induktion der SFK-Aktivierung durch Modellpartikel	38
3.2	Einfluss von SFK auf die Aktivierung von Erk1/2 und Akt	41
3.3	Einfluss von c-Src auf die Aktivierung von Akt	43
3.4	Untersuchung der Interaktion zwischen Membranrezeptoren	45
3.5	Einfluss von ufCB auf die Lokalisation von SFK in Lipid Rafts	48
3.6	Auswirkung von ufCB auf die Lokalisation von EGF-R in Lipid Rafts	52
3.7	Abhängigkeit der Translokation von SFK und EGF-R von der Partikelgröße	54
3.8	Effekte von Lipidmediatoren auf die Translokation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts	56
3.9	Effekt von Lipidmediator C <sub>6</sub> -Ceramid auf die Phosphorylierung von Erk1/2 und SFK	60
3.10	Wirkung von Ectoin auf die partikelinduzierte Translokation von SFK und EGF-R aus Lipid Rafts	62
3.11	Einfluss von Ectoin auf die partikelinduzierte Aktivierung von SFK	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	Aktivierung von SFK durch ultrafeine Partikel	68
4.2	Beteiligung von SFK an der partikelinduzierten Proliferation	71
4.3	Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts	73
4.4	Partikel beeinflussen die Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts	75

4.5 Einfluss von Lipidmediator Ceramid auf die Lokalisation von SFK und EGF-R	77
4.6 Wirkung von Ectoin auf die partikelinduzierte Translokation von SFK und EGF-R	80
4.7 Einordnung der Arbeit	82
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6. Summary</b>	<b>86</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>87</b>
<b>Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>103</b>

## Abkürzungen

∅	Durchmesser
A. dest	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C32	Compound 32 (4-[(3-Bromophenyl)amino]-6,7-dimethoxyquinazolin)
(uf)CB	(ultrafeine) Carbon Black-Partikel
CTB	Untereinheit B des Cholera-Toxins
CTB-HRP	Untereinheit B des Cholera-Toxins gekoppelt mit Peroxidase
d <sub>ae</sub>	aerodynamischer Durchmesser
DEP	<i>diesel exhaust particles</i> Diesel-Emissions-Partikel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Desoxycholsäure-Natriumsalz
DRM	<i>detergent resistant membrane</i>
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
<i>et al.</i>	und andere
FCS	<i>fetal calb serum</i> (fötales Kälberserum)
<i>g</i>	Gravitation
GSH	Glutathion
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI-Anker	Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker
HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G



## Abkürzungen

---

IgM	Immunglobulin M
IL-8	Interleukin 8
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
JNK	Jun N-terminale Kinasen
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEK oder MKK	MAP-Kinasen-Kinasen
MKKK	MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen
MBCD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NP	Nanopartikel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalz-Lösung
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3-phosphat
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)
PP2	Inhibitor der Src-Familie-Kinasen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rel.	relative
RLE-Zellen	Rattenlungenepithel-Zellen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RGD	Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
SFK	Src-Familie-Kinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMase	Sphingomyelinase
TBST	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## Abkürzungen

---

Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
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

### 1.1 Biologische Membranen

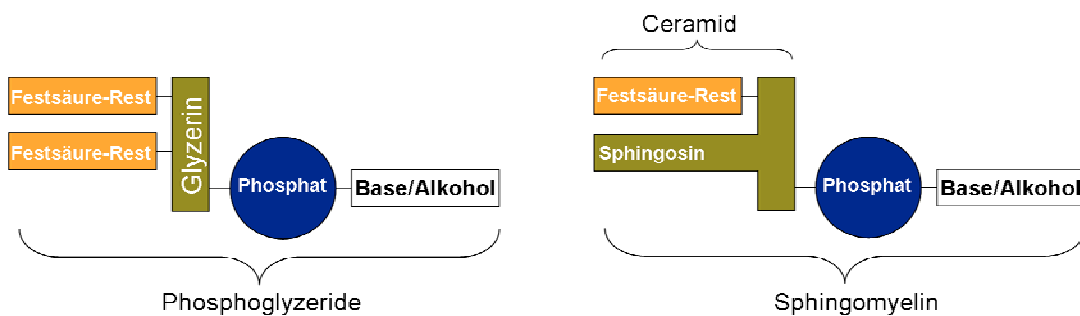
Biologische Membranen sind für die Funktion und das Überleben aller Zellen von entscheidender Bedeutung: Die Plasmamembran, die eukaryotische Zellen umgibt, grenzt das Zellinnere vom umgebenden Außenmilieu ab. Zudem werden einzelne Organellen im Inneren dieser Zellen von Membranen umschlossen und tragen somit zur Bildung von Funktionseinheiten bei. In diesen Kompartimenten können so, abgegrenzt vom Zytoplasma, spezifische biochemische Vorgänge ablaufen, die mitunter bei Nichtabgrenzung für die Zelle toxisch wären. Über Membranen finden sowohl aktive als auch passive Transportvorgänge statt. Außerdem kann die Zelle über Oberflächenmoleküle auf der Plasmamembran mit Nachbarzellen kommunizieren oder auf externe Stimuli reagieren.

Membranen bestehen aus Lipiden und Proteinen, wobei das Verhältnis beider Komponenten zueinander sowohl innerhalb aller in den Zellen vorhandenen biologischen Membranen als auch zelltypspezifisch variiert (Boesze-Battaglia *et al.*, 1997). Bei einem Großteil der Membranlipide handelt es sich um Phospholipide. Diese bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und zwei hydrophoben Kohlenstoffresten, in der Regel Fettsäuren, und sind damit amphiphile Moleküle. Diese Eigenschaft ist für die Organisation biologischer Membranen besonders wichtig und resultiert in der Ausbildung einer Lipiddoppelschicht, wobei die hydrophoben Anteile nach innen weisen und die hydrophilen nach außen (Whitfield, 2004). Diese ca. 3 nm dicke Doppelschicht bildet die Membran-Grundstruktur (Chen & Moy, 2000).

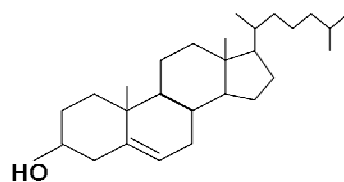
Zu den Phospholipiden gehören Phosphoglyzeride und Sphingolipide (Abb. 1.1). Beide sind chemisch betrachtet Phosphodiester. Die Phosphoglyzeride sind aus Glycerin aufgebaut, welches auf der einen Seite mit zwei Fettsäureresten und auf der anderen Seite über einen Phosphat-Rest mit einer Base bzw. einem Alkohol verestert ist. Sie bilden den mengenmäßig wichtigsten Anteil zellulärer Membranen. Vertreter dieser Gruppe sind Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin (Yamaji-Hasewaga & Tsujimoto, 2006). Daneben sind die Sphingolipide ebenfalls essentielle Membranbestandteile und leiten sich in ihrer Struktur vom Aminoalkohol Sphingosin ab. Ist Sphingosin mit einer Fettsäure amidartig verknüpft, entsteht Ceramid, der Vorläufer

der Sphingolipide. Andere wichtige Vertreter sind Sphingomyelin und Glykosphingolipide (Hoekstra *et al.*, 2003). Eine weitere Gruppe von Membranlipiden umfasst die Sterole, mit ihrem Hauptvertreter Cholesterol (Abb. 1.1) Dieses lagert sich als unpolares Molekül zwischen die hydrophoben Reste der Phospholipide ein und beeinflusst somit die Fluidität der Membran. Zudem bewirken die starren Sterolringe, dass die Fettsäureketten der Phospholipide dichter und gleichmäßiger gepackt vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass Cholesterol hier bevorzugt mit Sphingolipiden interagiert (Ramstedt & Slotte, 2002). Sphingolipide sind fast ausschließlich im äußeren Membranblatt (*outer leaflet*) zu finden, wohingegen einige Phosphoglyzeride, wie z. B. Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin, auf das innere Membranblatt (*inner leaflet*) beschränkt sind (Bretscher, 1973; Yamaji-Hasewaga & Tsujimoto, 2006). Cholesterol dagegen ist in beiden Membranblättern nachzuweisen.

## Phospholipide



## Cholesterol



**Abb. 1.1:** Schematischer Aufbau der Phospholipide und Strukturformel von Cholesterol (modifiziert nach Peter Karlson „Biochemie und Pathobiochemie“, 2005: S.296 und S. 323).

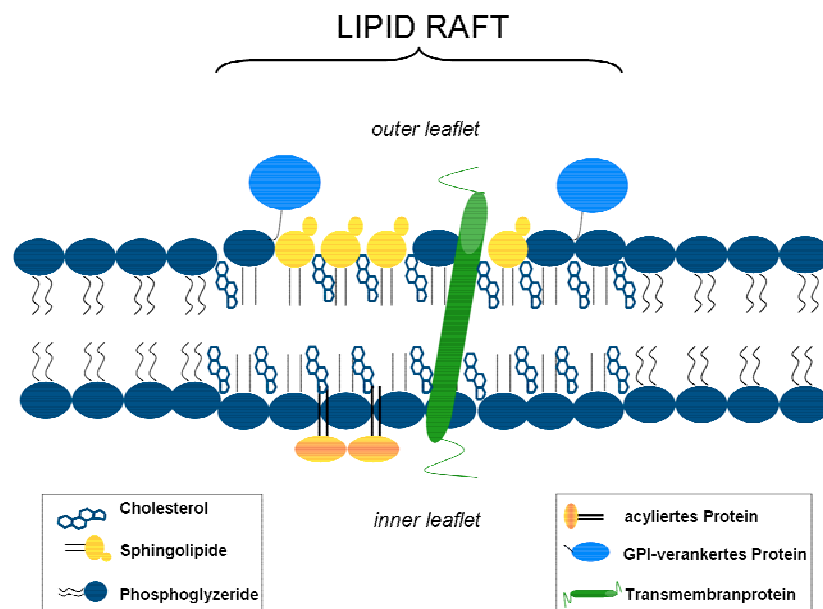
In die Lipiddoppelschicht sind verschiedene Arten von Membranproteinen eingelagert. Dazu gehören Proteine verschiedenster Größe und Funktion, wie z. B. Membranrezeptoren, Ionenkanäle und Transporterproteine (Fiedler *et al.*, 2010). Dabei können die einzelnen Proteine die Membran durchspannen oder durch kovalente Bindungen, z. B. über spezifische Zuckerreste des Proteins mit dem Phospholipid Phosphatidylinositol, in der Plasmamembran verankert sein (sogenannte Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Anker). Solche GPI-verankerten Proteine konnten in Epithelzellen auf der apikalen Seite, d.h. der gegen das äußere Milieu gerichteten Seite der Plasmamembran nachgewiesen werden (Brown & Waneck, 1992). Die basolaterale Seite, welche die Epithelzellen über die Basallamina mit dem darunterliegenden Gewebe verbindet, unterscheidet sich von der apikalen in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung. Diese Zellpolarität, d.h. die Ausbildung einer apikalen und einer basolateralen Seite, kann in vielen eukaryotischen Zelltypen gefunden werden (Handler, 1989).

Nach dem Flüssig-Mosaik Modell sind Proteine und Lipide zufällig in der Membran verteilt und lateral frei in der Lipiddoppelschicht beweglich (Singer & Nicolson, 1972). Untersuchungen zeigen allerdings, dass es in der Membran Bereiche mit einer hohen Konzentration von Proteinen sowie einer asymmetrischen Lipidverteilung gibt (Damjanovich *et al.*, 1997; Simons & van Meer, 1988). Diese Beobachtungen führten zur Formulierung des „dynamisch strukturierten Mosaikmodells“. Danach ist die laterale Diffusion von Membrankomponenten durch die Bildung lokaler Proteinkomplexe oder Lipidmikrodomänen eingeschränkt. Diese supramolekularen Strukturen unterliegen dank äußerer Einflüsse oder intermolekularer Kräfte einer ständigen Dynamik, d.h. einem fortwährenden Auf-, Ab- und Umbau (Vereb *et al.*, 2003). Zur Formulierung dieses Modells trug die Postulierung der Existenz von Membranmikrodomänen oder „Lipid Rafts“ als funktionelle Einheiten der Membran bei (Simons & Ikonen, 1997).

### **1.1.1 Lipidmikrodomänen (Lipid Rafts) in der Membran**

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben bereits in den 1970er Jahren die Existenz von mosaikähnlichen Lipid-Domänen und damit eine heterogene Verteilung von Lipiden in Membranen, wobei hier die Frage nach der biologischen Funktion dieser Domänen noch

nicht im Fokus stand (Stier & Sackmann, 1973; Hui & Parsons, 1975). Im Jahr 1982 formulierte Karnovsky das Konzept der Organisation von Lipiden in der Membran als Domänen mit möglicher Bedeutung für deren Struktur und Funktion (Karnovsky *et al.*, 1982). Einige Jahre später postulierten Kai Simons und Gerrit van Meer das apikale Membranproteine in polaren Epithelzellen während ihres Transports vom *trans*-Golgi zur apikalen Membranseite mit sphingolipidreichen Mikrodomänen assoziieren (Simons & van Meer, 1988). Es zeigte sich, dass GPI-verankerte Proteine in diesen sphingolipidreichen Domänen angereichert sind, wobei dieser Anker als Signalgeber für den gerichteten Transport der Proteine zur apikalen Zellmembran benötigt wird (Brown *et al.*, 1989, Brown & Rose, 1992). Aufbauend darauf wurde die sogenannte „Raft-Hypothese“ formuliert. Demnach bilden Sphingolipide zusammen mit Cholesterol laterale Assoziationen (Lipid Rafts) in der Membran, die von Phosphoglyzeriden umgeben sind (Simons & Ikonen, 1997). In diesen Rafts sind bestimmte Proteine selektiv angereichert, unter anderem die bereits erwähnten GPI-verankerten Proteine, viele Transmembranproteine (Sargiacomo *et al.*, 1993) aber auch doppelt acetylierte Proteine wie z. B. Proteine der Src-Kinase-Familie (Song *et al.*, 1997; Abb. 1.2). Es gibt Hinweise, dass verschiedene Rafts unterschiedlicher Proteinkomposition in einer Zelle koexistieren (Pike, 2003).



**Abb. 1.2:** Modellvorstellung zum Aufbau der Lipid Rafts mit spezifischer Lipid- und Proteinzusammensetzung (modifiziert nach Lingwood & Simons, 2010).

Die traditionelle biochemische Methode zur Isolierung von Rafts ist die Behandlung der Zelllysate mit eiskaltem Puffer, der 1 % Triton X-100 enthält. Aufgrund ihrer spezifischen Lipidzusammensetzung aus Cholesterol und Sphingolipiden sind Rafts unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 und verfügen über eine geringere Dichte als die übrigen Membranfraktionen (London & Brown, 2000). Während einer Dichtegradienten-Ultrazentrifugation über einen Sucrosegradienten von 5 % bis 30 % reichern sich die Detergenz-resistenten Membranen (DRM, *detergent resistant membranes*) im oberen Bereich des Gradienten an (Brown & Rose, 1992). Diese DRM sind eine Mischung aus allen in der Zelle vorhandenen Lipidmikrodomänen und spiegeln somit nicht die *in vivo* Situation wider. Trotzdem enthalten sie „Raftmaterial“ und sind damit ein Ausgangspunkt, um Raft-assoziierte Proteine zu identifizieren. Zudem können Veränderungen im Löslichkeitsverhalten von Proteinen unter wechselnden physiologischen Bedingungen Hinweise auf deren Raft-Assoziation liefern (Hanzal-Bayer & Hancock, 2007). Um die Raft-Fraktion nach der Ultrazentrifugation zu identifizieren, werden Markerproteine wie GPI-verankerte Proteine oder Flotilline verwendet (Simons & Ikonen, 1997; Babuke & Tikkanen, 2007). Auch Gangliosid G<sub>M1</sub>, ein wichtiges in Lipid Rafts angereichertes Sphingolipid, wird als Raft-Marker benutzt (Harder *et al.*, 1998).

Ein zusätzlicher biochemischer Ansatzpunkt zur Untersuchung der Funktion von Rafts ist die Reduktion des Gehalts an Cholesterol, da dieses für die Integrität der Rafts essentiell ist (Rietveld & Simons, 1998). Mittels Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) kann Cholesterol aus der Membran depletiert werden (Klein *et al.*, 1995). Cyclodextrine bestehen aus verknüpften Glukosemolekülen, die eine konusförmige Struktur mit zentralem, lipophilem Hohlraum bilden. Sie besitzen die Kapazität, lipophile Moleküle in diesem Hohlraum einzuschließen (Pitha *et al.*, 1988). Cholesterol formt zusammen mit M $\beta$ CD Einschluss-Komplexe, deren Löslichkeit dadurch erhöht wird. Die Entfernung von Cholesterol aus der Membran hat einen Einfluss auf die Assoziation von Proteinen mit DRM-Fractionen (Martens *et al.*, 2000).

Neuere lichtmikroskopische Techniken erlauben es, Auflösungen im nm-Bereich zu erzielen und damit Rafts *in vivo* zu untersuchen. Mittels photoaktivierter Lokalisationsmikroskopie (PALM, *photoactivation localization microscopy*) konnten Hämagglutinine, Raft-assoziierte Proteine, in dynamischen Clustern im Größenbereich

von ca. 40 nm in der Zellmembran lebender Fibroblasten lokalisiert werden (Pralle, 2000; Hess *et al.*, 2007). Mit Hilfe der STED-Mikroskopie (*stimulated emission depletion*) konnte in Epithelzellen unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden, dass Sphingolipide und GPI-verankerte Proteine transient mit cholesterolreichen Komplexen interagieren und Bereiche in der Plasmamembran von ca. 20 nm Durchmesser bilden (Eggeling *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse werden Lipid Rafts gegenwärtig als nanometergroße, dynamische, cholesterol- und sphingolipidreiche Domänen in der Plasmamembran lebender Zellen beschrieben (Lingwood & Simons, 2010).

Solchen Mikrodomänen werden eine Reihe unterschiedlicher Funktionen zugeschrieben, wie z. B. eine Beteiligung an der intrazellulären Sortierung von Proteinen in polarisierten Zellen und der Zellmigration (Simons & Ikonen, 1997; Hanzal-Bayer & Hancock, 2007). Ein spezifischer Subtyp von Rafts, die Caveolae, sind an endozytotischen Prozessen in Zellen beteiligt (Kirkham *et al.*, 2005). Caveolae sind lichtmikroskopisch erkennbare Einstülpungen der Plasmamembran, welche ebenfalls cholesterol- und sphingolipidreich sind, aber als Strukturproteine Caveoline enthalten (Parton, 1996). Darüber hinaus sind Lipid Rafts an Signaltransduktionsprozessen beteiligt, was eine ihrer wichtigsten Funktionen zu sein scheint (Simons & Toomre, 2000).

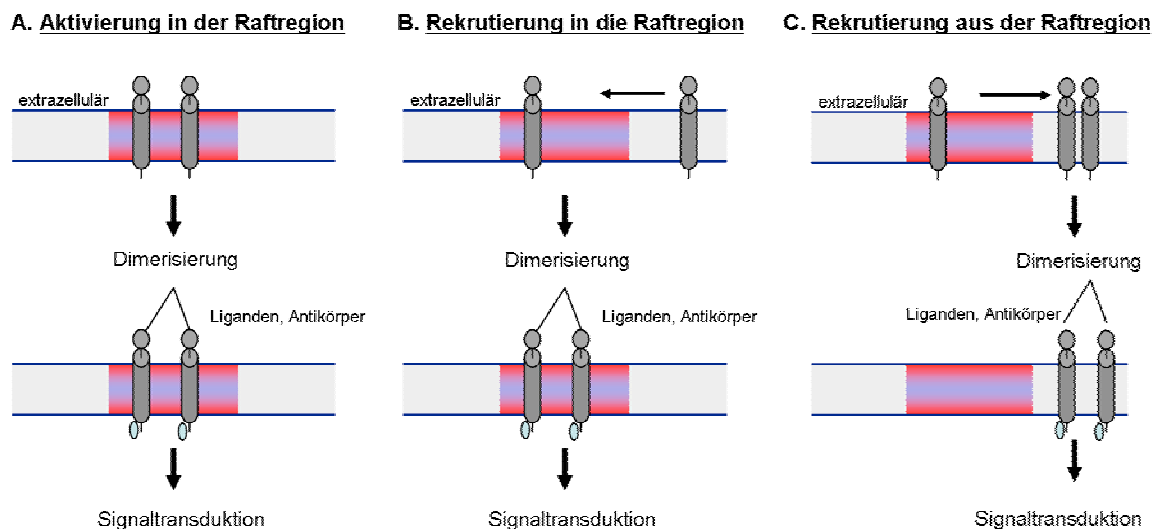
### **1.1.2 Die Rolle von Lipid Rafts bei Signaltransduktionsprozessen**

Signaltransduktionsprozesse in der Zelle werden durch komplexe Interaktionen zwischen Liganden, Rezeptoren und Kinasen initiiert und reguliert. Lipidmikrodomänen bieten aufgrund ihres hohen Bestandes an Signalproteinen - es konnte hier eine 10-fach stärkere Anreicherung gefunden werden (Foster *et al.*, 2003) - eine geeignete Plattform für die Initiation und Regulation dieser Prozesse. Als Antwort auf intra- und extrazelluläre Stimuli wird ihre Größe und Zusammensetzung dynamisch verändert und aufgrund der räumlichen Nähe einzelner Proteine kann die Signaltransduktion schnell, effizient und spezifisch ablaufen (Simons & Toomre, 2000). Die Initiierung von Signalkaskaden ist hier auf verschiedenen Wegen denkbar (Abb. 1.3): zum einen können Proteine, die innerhalb der Raft-Region lokalisiert sind, direkt dort aktiviert werden (A). Alternativ ist auch eine Rekrutierung von Signalproteinen aus der



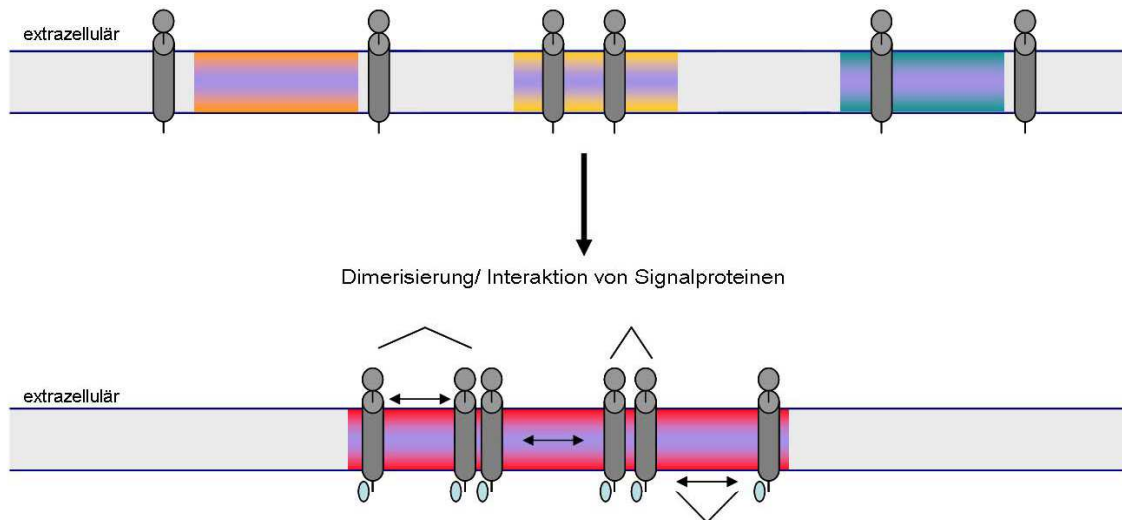
Nicht-Raft-Fraktion in die Raft-Fraktion (B) oder umgekehrt (C) möglich, um Signalkaskaden zu initiieren. Zudem können sich verschiedene Subpopulationen von Rafts, mit unterschiedlicher Ausstattung an Proteinen, zusammenlagern („Clustering“), so dass verschiedene Signalproteine miteinander interagieren können (Abb. 1.4 D). Eine Zerstörung der Rafts könnte somit eine Deregulierung bestimmter Signalprozesse bewirken (Pike, 2003).

Der erste Signaltransduktionsprozess, bei dem eine Beteiligung von Lipid Rafts gezeigt werden konnte, war die durch Immunglobulin E (IgE) induzierte Signalkaskade in Mastzellen (Baird *et al.*, 1999). IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen werden nach Bindung von IgE in Raft-Domänen rekrutiert und von Src-Familie-Kinasen wie Fyn und Lyn phosphoryliert. Eine Kolo-kalisation dieser Signalmoleküle mit dem Raft-Marker G<sub>M</sub>1 nach Rezeptoraktivierung konnte auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Stauffer & Meyer, 1997). Durch Cholesteroldepletion mittels Methyl-β-cyclodextrin wird die durch IgE induzierte Signalkaskade gestört (Sheets *et al.*, 1999).



**Abb.1.3:** Modelle zur Initiierung von Signalkaskaden durch Lipid Rafts. Die Raft-Domänen sind zweifarbig dargestellt im Vergleich zur umgebenden Membran. Erklärungen siehe Kapitel 1.1.2 (modifiziert nach Simons & Toomre, 2000).

**D. Zusammenlagerung einzelner Rafts („Clustering“)**



**Abb. 1.4:** Modell zur Initiierung von Signalkaskaden durch zur Zusammenlagerung einzelner Lipid Rafts. Die Raft-Domänen sind zweifarbig dargestellt im Vergleich zur umgebenden Membran. Erklärungen siehe Kapitel 1.1.2 (modifiziert nach Simons & Toomre, 2000).

Wie oben beschrieben, ist für die Initiierung einiger Signalprozesse eine Translokation von Rezeptoren oder Signalmolekülen aus der Raft-Fraktion in die Nicht-Raftregion notwendig. Dies konnte für die Signalkaskade des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R, *epidermal growth factor receptor*) in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden. In unstimulierten Fibroblasten z. B. ist der EGF-R in Caveolae lokalisiert und kann nach einer Stimulation der Zellen mit EGF nicht mehr in diesen Domänen gefunden werden (Mineo *et al.*, 1999). Die Arbeitsgruppe von Roepstorff *et al.* (2002) konnte mittels Immunfluoreszenzstudien in HeLa-Zellen (Zervixkarzinom-Zelllinie) zeigen, dass der EGF-R in unstimulierten Zellen mit dem Raft-Marker Gangliosid  $G_M1$  kolokalisiert, sich aber nur ein geringer Teil des EGF-R in Caveolae befindet. Biochemisch konnte hier eine Assoziation des EGF-R mit DRM gezeigt werden, die nach Depletion von Cholesterol aufgehoben wird. Eine Verringerung des Gehalts an Cholesterol in den Lipid Rafts erhöht zudem die Anzahl der Bindungsstellen für EGF. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass ein in cholesterolreichen

Domänen lokalisierter EGF-R weniger gut zugänglich ist für die Bindung von Liganden und die Raft-Assoziation damit als negativer Regulator für die EGF-R-abhängige Signaltransduktion angesehen werden kann. Mehrere Arbeiten zeigen, dass Ligandenbindung, Dimerisierung und Autophosphorylierung des EGF-R nach Zerstörung der Raft-Integrität erhöht sind (Pike & Casey 2002; Ringerike *et al.*, 2002; Balbis & Posner, 2010).

### 1.2 Signaltransduktion als Reaktion auf Umwelteinflüsse

Die Zelle reagiert auf endogene und umweltbedingte Reize mit der Induktion von Signalkaskaden und reguliert damit wichtige biologische Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Genexpression oder Immunreaktionen. Plasmamembran-Rezeptoren können extrazelluläre Signalmoleküle binden und die Signale zu Effektorproteinen ins Zellinnere weiterleiten. Dabei kann eine Kaskade von nachgeschalteten Effektormolekülen aktiviert werden. Signalkaskaden können durch verschiedene Umweltstimuli bzw. Xenobiotika induziert und/oder beeinflusst werden. Zu solchen Umweltstimuli zählen z. B. elektromagnetische Wellen wie UV-Strahlung. Eine Bestrahlung von humanen Keratinozyten mit UVA (320-400 nm) resultiert in einer Induktion der Genexpression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Grether-Beck *et al.*, 2005) und führt zudem zu einer Veränderung der Lipidzusammensetzung von Mikrodomänen. Dies beeinflusst UVA-induzierte Signalprozesse (Grether-Beck *et al.*, 2008).

Auch verschiedene persistierende Umweltgifte können Signalkaskaden induzieren: Dioxine wie das Sevesogift 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) passieren als lipophile Liganden die Zellmembran und binden an den im Zytosol vorliegenden Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor-Komplex. (AhR, *aryl hydrocarbon receptor*). Dieser gelangt daraufhin in den Zellkern und induziert dort die Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Cytochrom P450-Familie (Denison & Nagy, 2003).

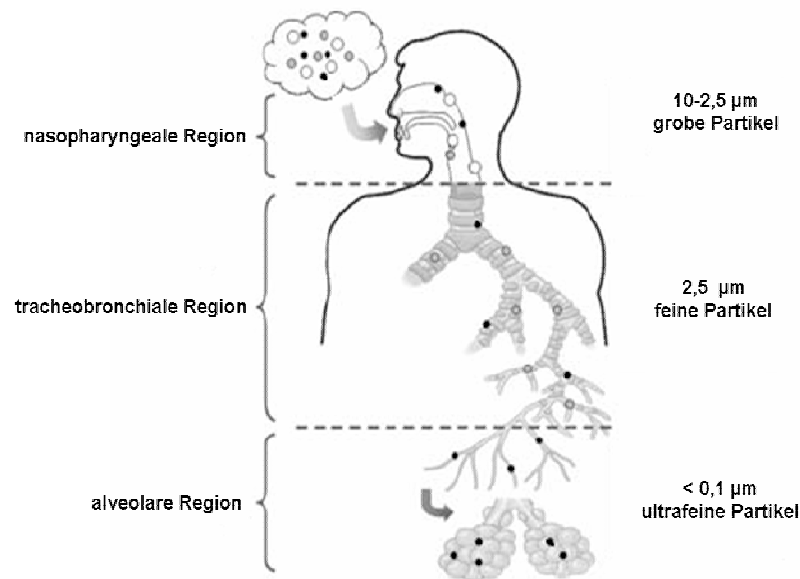
Einen wichtigen Umweltstimulus stellen außerdem inhalierbare Partikel in der Luft wie z. B. Kohlenstaub, Diesel-Emissions-Partikel (DEP) oder Asbestfasern dar. Studien haben gezeigt, dass diese Partikel verschiedene Signalwege aktivieren, die mit Tumorpromotion oder Entzündung assoziiert sind (Überblick in Albrecht *et al.*, 2004).

Eine besondere Bedeutung in diesem Zusammenhang hat in den letzten Jahren die ultrafeine Partikelfraktion des Schwebstaubs in der Luft erlangt.

### 1.2.1 Ultrafeine Partikel

Schwebstaub in der Außenluft wird auch als „*particulate matter*“ (PM) bezeichnet, und die darin enthaltenen Schwebstaubpartikel variieren in chemischer Zusammensetzung und Größe (Lahl & Steven, 2005). Die Klassifizierung dieser Partikel erfolgt anhand des aerodynamischen Durchmessers ( $d_{ae}$ ). Dieser ist definiert als der Durchmesser einer Kugel der Dichte  $1 \text{ g/cm}^3$ , welche die gleiche Sinkgeschwindigkeit in wirbelfreier Luft hat wie der Partikel selber (Umweltbundesamt, 2005). Danach werden unter der Bezeichnung  $PM_{10}$  alle Partikel zusammengefasst, die einen  $d_{ae}$  kleiner als  $10 \mu\text{m}$  haben. Darin enthalten sind grobe Partikel ( $PM_{10-2,5}$ ), feine Partikel ( $PM_{2,5}$ ) sowie ultrafeine Partikel (UFP) mit einem  $d_{ae}$  kleiner als  $100 \text{ nm}$  ( $PM_{0,1}$ ) (Oberdörster *et al.*, 2005; Bérubé *et al.*, 2007). Die Hauptquelle für PM, vor allem  $PM_{2,5}$  und  $PM_{0,1}$ , sind Verbrennungsprozesse aller Art.

In epidemiologischen Studien zeigt sich vor allem für Personen mit kardiovaskulären Erkrankungen und obstruktiven Lungenerkrankungen eine Assoziation zwischen der Exposition gegenüber PM und einem Anstieg der Mortalitätsraten (Dockery *et al.*; 1993, Pope *et al.*, 1995). Eine chronische Exposition gegenüber verbrennungsgenerierten Partikeln in der Luft ist zudem ein wichtiger Umweltrisikofaktor für die Lungenkrebs-Mortalität (Pope *et al.*, 2002). Im städtischen Raum entfallen ca. 50 % aller  $PM_{10}$  auf verbrennungsgenerierte ultrafeine Partikel (Donaldson & Stone, 2003). Von der ultrafeinen Partikelfraktion scheint eine besondere Gefahr auszugehen: Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass UFP in der Lunge stärker entzündlich wirken als feine Partikel der gleichen chemischen Zusammensetzung (Ferin, 1994; Oberdörster *et al.*, 2001; Gilmore *et al.*, 2004). PM gelangen vorrangig durch Inhalation in den Organismus. Ultrafeine Partikel haben aufgrund ihrer geringen Größe eine hohe Depositionswahrscheinlichkeit in den Alveolen (Oberdörster *et al.*, 2005; Bérubé *et al.*, 2007; Abb.1.5).



**Abb. 1.5:** Depositionswahrscheinlichkeit der einzelnen inhalierbaren Partikelfractionen innerhalb des Respirationstraktes des Menschen (modifiziert nach Bérubé *et al.*, 2007).

Sie werden dort von alveolaren Makrophagen weniger effizient phagozytiert und abtransportiert als feine Partikel (Kreyling & Scheuch, 2000), was in einer gesteigerten Interaktion mit Lungenepithelzellen resultiert (Albrecht *et al.*, 2004; Donaldson *et al.*, 2005). Die Partikeldeposition in der Lunge erfolgt nicht gleichmäßig - es konnten Bereiche identifiziert werden, in denen die Zellen lokal hohen Partikelkonzentrationen ausgesetzt sind (Balashazy *et al.*, 2003). Bereits bestehende pathologische Veränderungen der Lunge haben ebenfalls einen Einfluss auf die Depositionseffizienz ultrafeiner Partikel (Anderson *et al.*, 1990).

Mit abnehmender Partikelgröße steigen bei gleicher Masse die Oberfläche und die Anzahl der Partikel stark an (Oberdörster *et al.*, 2005). Die große Oberfläche der ultrafeinen Partikel, an der sich Übergangsmetalle und organisch-chemische Substanzen anlagern können, gepaart mit der hohen Depositionseffizienz in Alveolen spielen in der Lungentoxikologie dieser Partikel eine entscheidende Rolle (Bérubé *et al.*, 2007).

Nach Deposition in der Lunge können UFP über Epithelzellen ins Interstitium gelangen und von hier aus in den Blutkreislauf übertreten. Somit können sie auch andere Organe wie Herz oder Gehirn erreichen (Oberdörster *et al.*, 2005).

Die zelluläre Aufnahme ultrafeiner Partikel hängt sowohl von den physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel selbst als auch vom Zelltyp ab. Verschiedene Prozesse wie Phagozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose oder Diffusion wurden als mögliche Mechanismen beschrieben (Unfried *et al.*, 2007). Aufgenommene UFP können mit intrazellulären Organellen und DNA interagieren, was ihr toxisches Potential deutlich erhöht (Geiser *et al.*, 2005).

Um die zellulären Effekte dieser ultrafeinen Partikel in *in vitro*- und *in vivo*-Studien zu untersuchen, werden Modellpartikel eingesetzt. Als Modellpartikel für verbrennungsgenerierte UFP wird ultrafeines Carbon Black (ufCB) genutzt, das aus Kohlenstoff-Nanopartikeln besteht. Ultrafeines CB gilt als gering löslicher Partikel mit niedriger intrinsischer Toxizität (Borm *et al.*, 2004) und wird industriell durch kontrollierte Verbrennung aus Kohlenwasserstoffen hergestellt (BéruBé *et al.*, 2007). Die einzelnen CB-Partikel tendieren dazu, miteinander zu verschmelzen (Aggregat-Bildung). Diese Aggregate können agglomerieren, wobei größere Partikel entstehen (Donaldson *et al.*, 2005; Donaldson & Stone, 2003). Carbon Black enthält nur geringe Mengen an Übergangsmetallen bzw. organischen Substanzen (Donaldson *et al.*, 2005). Deshalb wird es in der Toxikologie als Modell für den Kohlenstoff-Partikelkern zur Untersuchung reiner Partikeleffekte eingesetzt (Donaldson *et al.*, 2001).

Die Fähigkeit ultrafeiner Partikel, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu induzieren, gilt als hauptverantwortlich für deren zelluläre Toxizität (Donaldson *et al.*, 2001; Nel *et al.*, 2006). Zu ROS zählen Moleküle, die aus der Aktivierung von Sauerstoff entweder durch Energie- oder Elektronentransfer gebildet werden, wie z. B. Superoxid-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $\cdot OH$ ) (Barthel & Klotz, 2005). ROS können dabei sowohl im zellfreien System aufgrund der Partikeleigenschaften, als auch durch Interaktion der Partikel mit zellulären Strukturen wie NADPH-Oxidasen gebildet werden (Wilson *et al.*, 2002; Unfried *et al.*, 2007). NADPH-Oxidasen, die in der Zellmembran lokalisiert sind, katalysieren die Reduktion von Sauerstoff, was in der Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  resultiert. Dieses kann durch Dismutasen in  $H_2O_2$  umgewandelt werden (Unfried *et al.*, 2007). In Gegenwart von z. B.  $Fe^{2+}$  an der Oberfläche einiger Partikel kann eine unvollständige Reduktion von  $H_2O_2$  stattfinden, die zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen führt (Fenton-Reaktion; Valavanidis *et al.*, 2008). Mit Hilfe von Enzymen wie Glutathion-Peroxidase oder Katalase kann die Zelle dem

oxidativen Potential von  $H_2O_2$  entgegenwirken. Die Glutathion-Peroxidase benutzt hierzu Glutathion (GSH) als Reduktionsäquivalent bei der Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser (Sies, 1999). Übersteigt die Bildung von ROS die antioxidative Kapazität der Zelle, kommt es zur Schädigung von Biomolekülen. Zudem können ROS aber auch auf zelluläre Signalwege einwirken (Barthel & Klotz, 2005; Unfried *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Partikelinduzierte Signaltransduktionsprozesse

Studien zeigen, dass partikelinduzierte ROS in der Lage sind, bestimmte Signalwege zu aktivieren. Diese können zur Induktion verschiedenster Endpunkte wie der Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine oder der Veränderung von Apoptose bzw. Proliferation führen (Albrecht *et al.*, 2004; Unfried *et al.*, 2007).

Auf Zellmembranebene wurde die Beteiligung von Rezeptoren wie dem EGF-R an partikelinduzierten Signalkaskaden beschrieben (Albrecht *et al.*, 2004; Marano *et al.*, 2010). Der Transmembranrezeptor EGF-R gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase. Seine Aktivierung erfolgt nach Ligandenbindung (z. B. durch den epidermalen Wachstumsfaktor EGF oder den Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor HB-EGF), aber auch durch oxidativen Stress (Fickova, 2002; Abdelmohsen *et al.*, 2003). Diese Aktivierung induziert Rezeptor-Dimerisierung, woraufhin die Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten in der Kinasedomäne des Rezeptors bewirkt wird (Herbst, 2004; Lemmon & Schlessinger, 2010). Dadurch werden intrazellulär verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die an Differenzierung, Überleben und Proliferation der Zelle beteiligt sind (Fickova, 2002). Studien belegen eine Partizipation des EGF-R an partikelinduzierten Signalprozessen, die zu verschiedenen Endpunkten führen. In humanen bronchialen Epithelzellen (HBE-Zellen) wurde die Beteiligung des EGF-R an der durch ufCB induzierten Proliferation nachgewiesen (Tamaoki *et al.*, 2004). Hier wurde zudem eine verstärkte Expression des EGF-R Liganden HB-EGF detektiert, der zur Transaktivierung des Rezeptors führt. In kultivierten Rattenlungenepithelzellen (RLE-6TN) wurde nach Belastung mit ufCB die parallele und unabhängige Induktion der Proliferation und der Apoptose beobachtet. Beide Endpunkte sind abhängig von der Aktivität des EGF-R. Zudem konnte hier eine

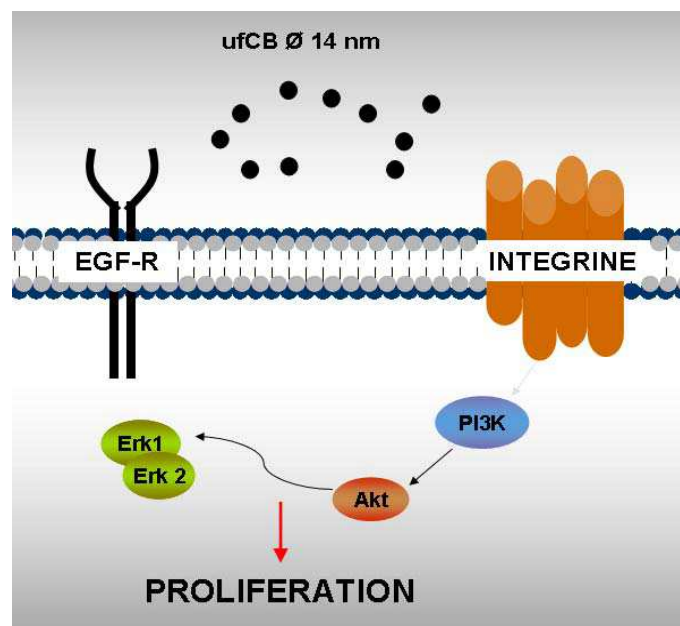
Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) gezeigt werden (Sydlik *et al.*, 2006).

MAP-Kinasen gehören zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen, die durch zahlreiche extrazelluläre Reize aktiviert, und in vier Gruppen eingeteilt werden können: die extrazellulär-regulierten Kinasen 1 und 2 (Erk1/2), Erk5, p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen und die Jun-N-terminalen Kinasen/Stress-aktivierten Proteinkinasen 1 und 2 (JNK/SAPK1/2) (Johnson & Lapadat, 2002; Severin *et al.*, 2010). MAP-Kinasen werden durch Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosin-Resten aktiviert. Dies erfolgt durch MAP-Kinasen-Kinasen (MKK), die ihrerseits durch MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MKKK) phosphoryliert und damit aktiviert werden (Cobb & Goldsmith, 1995; Severin *et al.*, 2010). Die Induktion dieser Signalkaskade führt zur Aktivierung einer Vielzahl von Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren. In humanen bronchialen Epithelzellen konnte nach Belastung mit uFCB die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 gezeigt werden, die an der Aktivierung der Expression von Interleukin-8 (IL-8) beteiligt ist (Kim *et al.*, 2005). Die Aktivierung von MAP-Kinasen konnte in mehreren Studien auch nach Belastung mit anderen verbrennungsgenerierten Partikeln wie DEP detektiert werden (Zhang *et al.*, 2004; Pourazar *et al.*, 2005).

Neben Zelloberflächenrezeptoren wie dem EGF-R kann auch die extrazelluläre Matrix (EZM) als Ziel von Partikel-Interaktionen zur Einleitung von Signalkaskaden angesehen werden (Albrecht *et al.*, 2004). Hier können Integrine die Verbindung zwischen der EZM und dem Zytoskelett herstellen. Integrine sind Transmembranrezeptoren. Sie besitzen eine extrazelluläre Domäne, die mit der EZM assoziiert ist, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne (Barczyk *et al.*, 2010). Der extrazelluläre Teil hat Bindungsstellen mit der sogenannten RGD-Sequenz (Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure) von EZM-Proteinen wie Fibronectin oder Fibrinogen (Cheresh, 1987; Aplin *et al.*, 1998). Änderungen der EZM-Struktur, die durch mechanische oder chemische Reaktionen induziert werden, können von Integrinen perzipiert und in die Zelle weitergeleitet werden. Integrine sind Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind. Bisher sind 18 verschiedene  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt. Nach Ligandenbindung erfolgt eine Zusammenlagerung von Integrin-Rezeptoren mit anschließender Konformationsänderung. Dies führt zur Bildung von sogenannten Fokaladhäsionskomplexen mit Zytoskelettproteinen und



Signalproteinen (Lafrenie & Yamada, 1996). Die von Integrinen regulierten Endpunkte sind dabei sehr vielfältig und reichen von Differenzierung, Überleben und Proliferation bis hin zu Apoptose (van der Flier & Sonnenberg, 2001; Cabodi *et al.*, 2010). Über die Rolle der Integrine bei der partikelinduzierten Signaltransduktion ist noch wenig bekannt. In Lungenepithelzellen konnte beobachtet werden, dass  $\beta$ 1-Integrine bei der durch ufCB-induzierten Proliferation mitbestimmend sind (Sydlik *et al.*, 2006, Abb. 1.6).



**Abb. 1.6:** Beteiligte Signalproteine bei der durch ufCB-induzierten proliferativen Signaltransduktion in RLE-6TN Zellen. (Sydlik *et al.*, 2006; Unfried *et al.*, 2008).

Auf Membranebene kann auch die Produktion von Lipidmediatoren (wie Ceramide, Phosphatidylinositol-3-phosphat [PIP<sub>3</sub>] oder Arachidonsäure) aus Phospholipidvorläufern zelluläre Signalkaskaden aktivieren (Leevers *et al.*, 1999; Hannun *et al.*, 2001; Farooqui, 2009). In alveolaren Makrophagen führte eine Belastung mit UFP zur Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>, welche die Hydrolyse von Membranphospholipden katalysiert. Dies induziert die Bildung von Prostaglandinen und führt somit zur Modulation der Entzündungsantwort (Beck-Speier *et al.*, 2005).

Auch der Signalweg über Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)/Proteinkinase B (Akt) gehört zu solchen Membran-abhängigen Signalkaskaden. Akt gehört zur Familie der Serin/Threoninkinasen und ist an der Regulation verschiedener Zellfunktionen wie

Proliferation, Überleben und Expression entzündungsfördernder Zytokine beteiligt (Abraham, 2005). Die Aktivierung von Akt erfolgt in Abhängigkeit von den Phosphatidylinositol-3 Kinasen, welche intrazellulär an der Zellmembran lokalisiert sind (Woodgett, 2005). Nach Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren katalysiert PI3-K die Bildung des Lipidmediators PIP3 aus der Membran. Dieser bindet an den N-Terminus von Akt, wobei Akt an die Membran rekrutiert wird. Hier kann die Kinase mit anderen Proteinen assoziieren und aktiviert werden. Für eine vollständige Aktivierung von Akt ist die Phosphorylierung der Aminosäuren Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> essentiell (Leevers *et al.*, 1999; Fayard *et al.*, 2010). Es konnte eine Beteiligung von ILK (*integrin-linked kinase*) an der Phosphorylierung von Ser<sup>473</sup> und damit Aktivierung von Akt gezeigt werden (Delcommenne *et al.*, 1998; Troussard *et al.*, 2003). Auch können Mitglieder der sogenannten Src-Familie-Kinasen (SFK) bei der Aktivierung von Akt involviert sein (Datta *et al.*, 1996). In *in vitro*-Studien induziert ufcB die Aktivierung des PI3-K/Akt Signalweges in Lungenepithelzellen (Unfried *et al.*, 2008). Hier wurde eine Akt-abhängige Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 gefunden (Abb.1.5).

Auf Membranebene sind die bereits erwähnten Src-Familie-Kinasen in partikelinduzierte Signalwege involviert. Cao *et al.* (2006) zeigten hier, dass SFK in Lungenepithelzellen nach Belastung mit DEP an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3 (*signal transducers and activators of transcription*) beteiligt sind. In humanen Lungenepithelzellen wurde nach Belastung mit Silica (PM<sub>2,5</sub>) die Phosphorylierung von SFK beobachtet, deren Aktivität bei der partikelinduzierten Freisetzung von IL-8 eine Rolle spielt (Øvrevik *et al.*, 2004).

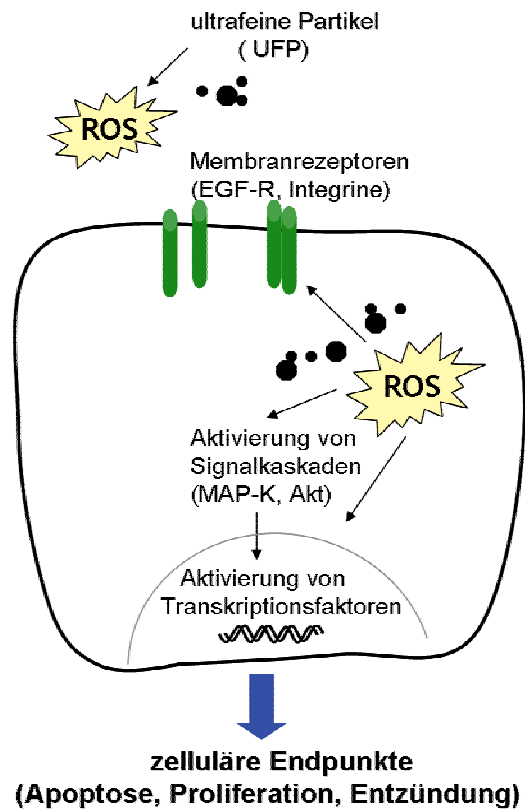
SFK haben wichtige Funktionen bei der Differenzierung, der Zelladhäsion und der Proliferation (Brown & Cooper, 1996). Die Familie der Src-Kinasen umfasst beim Menschen 11 Mitglieder, davon werden c-Src, Fyn und Yes in allen Zelltypen exprimiert (Thomas & Brugge, 1997; Rucci *et al.*, 2008). SFK haben zwei wichtige Phosphorylierungsstellen, die ihre Aktivität beeinflussen. Im inaktiven Zustand ist Tyr<sup>527</sup> am C-Terminus des Proteins phosphoryliert (Bradshaw, 2010). Dadurch nimmt das Protein eine inaktive Konformation ein. Durch die Aktivität verschiedener Phosphatasen wird Tyr<sup>527</sup> dephosphoryliert, was eine interne Konformationsänderung bewirkt. Hierdurch wird Tyr<sup>416</sup> in der Kinasedomäne phosphoryliert. Für die maximale

Kinaseaktivität von SFK ist die Phosphorylierung an diesem Tyr<sup>416</sup> entscheidend (Roskoski *et al.*, 2004; Giannoni *et al.*, 2010). Zudem kann durch Oxidation von Cystein-Resten die Aktivität von SFK beeinflusst werden (Giannoni *et al.*, 2005). SFK sind Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, deren Bindung an Membranen über eine am *N*-Terminus des Proteins gebundene Fettsäure erfolgt (Myristoylierung). Gebunden an die zytoplasmatische Seite der Membran können sie so mit verschiedenen Rezeptoren und Integrinen interagieren (Thomas & Brugge, 1997). Sie können unter anderem die Aktivität des EGF-R modulieren, indem sie in der zytosolischen Domäne des Rezeptors Tyrosin-Reste phosphorylieren (Biscanti *et al.*, 1999). Bis *dato* konnte aber noch keine Beteiligung von SFK an der durch uFCB induzierten Signaltransduktion beschrieben werden.

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

In einem zusammenfassenden Modell zum Mechanismus UFP-induzierter Toxizität führt partikelinduzierter oxidativer Stress auf mehreren Ebenen zu einer Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (Abb. 1.7). Die damit verbundene Induktion zellulärer Endpunkte wie Apoptose, Entzündung oder Proliferation kann das Potential zur Entwicklung adverser gesundheitlicher Effekte besitzen. Die Beeinflussung von Signalwegen durch Partikel kann somit zu deren Toxizität beitragen. Zudem stehen aktuell neben Umweltpartikeln vermehrt industriell generierte Nanopartikel im Fokus, die in Kosmetika oder Nahrungsmitteln Verwendung finden können (Choksi *et al.*, 2010; Bouwmeester *et al.*, 2009). Die Aufklärung UFP-induzierter Signalwege kann bei der Identifikation von Risiken, die von diesen Materialien ausgehen, eine Rolle spielen.

Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb die molekularen Mechanismen der partikelinduzierten Proliferation mit Hinblick auf die Funktion von Membranmikrodomänen als Signalplattformen.



**Abb. 1.7:** Modell zum molekularen Mechanismus der Toxizität ultrafeiner Partikel (modifiziert nach Albrecht *et al.*, 2004).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ultrafeines Carbon Black (ufCB) führt in Lungenepithelzellen unter Beteiligung der Membranrezeptoren EGF-R und  $\beta$ 1-Integrine zur Induktion von Proliferation (Sydlik *et al.*, 2006). Daneben zeigt die Aktivierung des Membran-abhängigen PI3-K/Akt Signalweges die Bedeutsamkeit der Zellmembran bei der proliferativen Signaltransduktion in diesen Zellen. Er stellt die Verbindung zwischen Rezeptoren, der beobachteten Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und dem Endpunkt Proliferation her (Unfried *et al.*, 2008).

In diesem Kontext sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Rolle von Membranmikrodomänen (Lipid Rafts) an der durch ufCB-induzierten Proliferation untersucht werden. Zudem wurde die Interaktionsvermittlung zwischen EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen genauer betrachtet, wobei die Untersuchung der Beteiligung Membran-assoziiierter SFK am proliferativen Signalweg im Vordergrund stand. Auch wurde die Rolle der SFK als Vermittler zwischen Rezeptoren und dem PI3-K/Akt Signalweg untersucht. Als *in vitro* Versuchssystem diente eine Rattenlungenepithel-Zelllinie (RLE-6TN), die mit ufCB als Modellpartikel für verbrennungsgenerierte UFP belastet wurde. Hier sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Sind Membran-assoziierte SFK an der Interaktion zwischen EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen beteiligt und welche Rolle spielen diese Kinasen bei der durch ufCB-induzierten Proliferation?
2. Können die bei der ufCB-induzierten Proliferation identifizierten Signalproteine in Membranmikrodomänen lokalisiert werden und hat ufCB einen Einfluss auf diese Lokalisation?
3. Haben Lipidmediatoren, die aus Lipid-Rafts nach Einwirkung von Xenobiotika gebildet werden können, einen Einfluss auf diese proliferativen Signalwege?
4. Wirken kompatible Solute wie Ectoin auf partikelinduzierte Signalereignisse protektiv?

## 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
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
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
pH-Meter, pH 211 Microprocessor	HANNA Instruments® Inc., Woonsocket, USA
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rotor der Ultrazentrifuge 50.2-Ti	Beckmann München
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

## Material und Methoden

---

Ultraschallbad, Bransonic 220	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge L8-M	Beckmann, München
Waagen	
Sartorius TE 124 S	Sartorius, Göttingen
Mettler PC 440 Delta Range	Mettler-Toledo, Schweiz
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen	
Eppendorf-Zentrifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Rotanta/RP	Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz
Sigma 3K30	B. Braun Biotech International, Melsungen
Mikro 200	Hettich, Tuttlingen

### Verbrauchsmaterialien:

AcroCap™ Filter Unit	Pall, Ann Arbor, USA
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Falconröhrchen	BD Bioscience, Canaan, USA
Filterpapier	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Nitrozellulose-Membran Protran BA 83	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
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
Zentrifugenröhrchen 6,5ml	Herolab, GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Zentrifugenröhrchen-Deckel	Herolab, GmbH Laborgeräte, Wiesloch

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
Cholera-Toxin Subunit B Peroxidase Conjugate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholsäure-Natriumsalz (DOC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Fluka, Buchs, Schweiz
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
INTERFERin™ Transfektionsreagenz	Polyplus-transfection Inc. New York, USA
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
Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich, Steinheim
OptiPrep™	Axis-Shield, Dundee, Schottland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
RC DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
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
Triton X-100	Fluka, Buchs, Schweiz
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe

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-Inhibitor:*

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

Der Inhibitor wurde als 10 mM Stocklösung in DMSO angesetzt. Vor einer Partikelbelastung der RLE-6TN Zellen wurden diese für 1 h mit einer Endkonzentration von 10 µM Compound 32 vorinkubiert.

*Integrin-Inhibitor:*

- monoklonaler Antikörper Hamster-Anti-Ratte CD29 (1-Integrin (NO Azide/Low Endotoxin), Isotyp Hamster Immunglobulin M (IgM), BD BioSciences Pharmingen, San José, USA).

Die Antikörper lagen in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Vor einer 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 diente als Negativkontrolle und wurde ebenfalls mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml vor einer Partikelbelastung der RLE-6TN Zellen für 1 h vorinkubiert.

*Src-Familie-Kinase Inhibitor:*

- PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine )  
Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach

Der Inhibitor wurde als 10 mM Stocklösung in DMSO angesetzt. Vor einer Partikelbelastung der RLE-6TN Zellen wurden diese für 1 h mit einer Endkonzentration von 5 bzw. 10 µM PP2 vorinkubiert.

#### **2.1.4 Stimulatoren und andere Substanzen**

- Ectoin [(S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid], LPS-frei, Reinheitsgrad 99 %, bitop AG, Witten, Germany

Die Substanz wurde als 100 mM Stammlösung in H<sub>2</sub>O (Sigma) angesetzt. Die Zellen wurden je nach Versuch für 4 h mit einer Endkonzentration von 0,01 bzw. 0,1 mM behandelt.

- C<sub>6</sub>-Ceramid (D-erythro-Sphingosine, N-Hexanoyl) Calbiochem Merck Biosciences, Schwalbach

Die Substanz wurde als 10 mM Stammlösung in DMSO angesetzt. Die Zellen wurden je nach Versuch mit einer Endkonzentration von 5 bzw. 10 µM behandelt.

### 2.1.5 Antikörper

#### *Primär-Antikörper:*

Kaninchen-Anti-Akt polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-Akt (Ser <sup>473</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-p44/42 MAP-Kinase polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr <sup>202</sup> /Tyr <sup>204</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Src monoklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-Src (Tyr <sup>416</sup> ) polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
Maus-Anti-GAPDH monoklonaler Antikörper	Imgenex, San Diego, USA
Kaninchen-Anti-EGF-R polyklonaler Antikörper	Millipore, Temecula, USA

GAPDH wurde in einer Konzentration von 1:20000 in 5 % BSA/TBST verwendet. Alle anderen Primär-Antikörper wurden 1:1000 in 5 % BSA/TBST eingesetzt.

#### *Sekundär-Antikörper:*

Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin G (IgG)	
Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziege-Anti-Maus Immunglobulin G (IgG)	
Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Die Sekundär-Antikörper wurden jeweils 1:2000 in 5 % BSA/TBST eingesetzt.

### 2.1.6 Zelllinie

*RLE-6TN:*

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie ist eine SV-40-transfizierte, immortalisierte alveolare Typ II Lungenepithel-Zelllinie aus adulten Ratten (ATCC, Manassas, USA; Driscoll *et al.*, 1995). Die Zellen wurden von Passage 8 bis 50 verwendet.

### 2.1.7 Partikel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ultrafeines Carbon Black (ufCB) als Modellpartikel für den Partikelkern von verbrennungsgenerierten Nanopartikeln verwendet. Hierbei handelt es sich um das Markenprodukt Printex<sup>®</sup> 90 der Firma Degussa (Frankfurt/Main), mit einem primären Durchmesser der Partikel von 14 nm. Die Verunreinigungen mit PAKs liegen unter 0,1 % (Stone *et al.*, 1998).

Zusätzlich wurden feine Kohlenstoffpartikel (fCB, Huber 990 von H. Haeffner & Co. Ltd, Chepstow) mit einem primären Durchmesser von 260 nm eingesetzt.

Von den eingewogenen Partikeln wurde eine Stammsuspension von 1 mg/ml in PBS angesetzt und 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert. Die Zellen wurden mit 1-10 µg/cm<sup>2</sup> Partikeln belastet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

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

Die RLE-6TN Zellen sind adhärenente Zellen, die einen Monolayer bilden. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in RLE-6TN Nährmedium auf Plastik-Gewebekulturflaschen bei 37°C, 5 % [v/v] CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Ein Mediumwechsel fand alle 2-3 Tage mit auf 37°C temperiertem Nährmedium statt.

Einmal in der Woche wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1 x mit vorgewärmtem PBS gewaschen und mit einer dünnen Schicht Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Nach 5 min Inkubation im Brutschrank wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Nährmedium inaktiviert und alles in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 6 min bei 100 g wurde das Pellet in 10 ml Nährmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 in neue Zellkulturflaschen verteilt.

#### RLE-6TN Nährmedium:

Nutrient Mixture F-12 Ham  
2 mM L-Glutamin  
5 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)  
50 U/ml Penicillin  
50 µg/ml Streptomycin  
2,5 µg/ml Amphotericin B

FCS wurde vor Gebrauch für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

#### 2.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen

Die Zellen wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden zwei 75 cm<sup>2</sup> große Kulturflaschen mit konfluentem Monolayer wie in Kapitel

2.2.1.1 beschrieben durch Trypsin-EDTA abgelöst und nach Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Nährmedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und 10 min auf Eis aufbewahrt. Nach Zugabe von 1 ml Einfriermedium (22 % DMSO [v/v] in FCS) wurden die Zellen bei -70°C eingefroren und 48 h später in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Gefrierkulturen aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 50 ml Nährmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation (6 min, 100 g) wurde das Zellpellet in 6 ml Nährmedium aufgenommen und je 3 ml Zellsuspension auf zwei 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen überführt. Nach 24 h wurden die Zellen erneut wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben passagiert.

### **2.2.1.3 Belastung der Zellen mit Partikeln und Inhibitoren**

Die RLE-6TN Zellen wurden mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und für ca. 20 h bis zu einer Konfluenz von 80 – 90 % in Nährmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für weitere 24 h in Serum-reduziertem Medium gehalten. Bei gleichzeitiger Verwendung verschiedener Inhibitoren wurden die Zellen für 1 h mit der jeweiligen Substanz bzw. mit der Lösungsmittelkontrolle vorbehandelt (vgl. Kapitel 2.1.3). Anschließend erfolgte die Partikelzugabe (vgl. Kapitel 2.1.6).

#### *Serum-reduziertes 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 Transfektion von siRNA

Der Mechanismus der RNA-Interferenz beschreibt einen Vorgang der sequenzspezifischen Stilllegung von Genen durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die zu einem bestimmten Abschnitt des Zielgens komplementär ist (Tuschl, 2001). Die dsRNA wird in 21-23 Nukleotide kleine Stücke prozessiert (*short interfering RNA*, siRNA) und in Einzelstränge entwunden, die nach Bindung an die Ziel-mRNA dessen Abbau einleiten (Bernstein *et al.*, 2001; Meister & Tuschl, 2004).

Die Expression eines spezifischen Gens kann molekularbiologisch durch Übertragung von synthetisch hergestellter siRNA in Zellen verringert werden.

RLE-6TN Zellen wurden in 6-well Kulturplatten mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Transfektionsmedium ausplattiert und 24 h später transfiziert. Dazu wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße pro Ansatz 200 µl Transfektionsmedium vorgelegt und 12 µl INTERFERin™-Transfektionsreagenz (Polyplus-transfection Inc., New York, USA) dazupipettiert. Jeweils 100 nM der c-Src siRNA (100 µM Stammlösung) wurden in das 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und nach kurzem Schwenken des Eppendorfgefäßes für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der Zellen gewechselt und der Ansatz dann vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Um unspezifische Effekte der Transfektion auf die Genexpression auszuschließen, wurde eine Negativ-Kontroll-siRNA (OR-0030-neg05, Eurogentec SA, Belgien) ebenfalls in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Zudem wurde als zusätzliche Kontrolle 12 µl INTERFERin™-Transfektionsreagenz ohne siRNA verwendet. Nach 18-stündiger Inkubation des Transfektionsansatzes auf den Zellen im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium entfernt. Die Zellen wurden 2 x mit warmem PBS gewaschen, mit 3 ml Serum-reduziertem Medium ausgehungert und wie beschrieben mit Partikeln belastet.

### Sequenzen c-Src siRNA

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>	<i>Herkunft</i>
c-Src-siRNA antisense	AAA-GUA-CCA-CUC-CUC-AGC-C99	Eurogentec SA (Belgien)
c-Src-siRNA sense	GGC-UGA-GGA-GUG-GUA-CUU-U99	Eurogentec SA (Belgien)

Transfektionsmedium

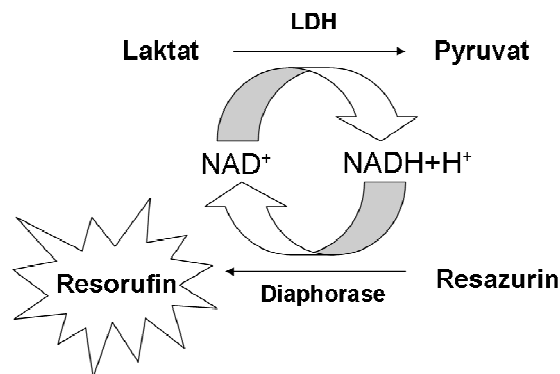
Nutrient Mixture F-12 Ham

2 mM L-Glutamin

5 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)

### 2.2.3 Zytotoxizitätsassay

Um zu überprüfen, ob die eingesetzten Konzentrationen an Partikeln und Stimulantien zytotoxisches Potential besitzen, wurde die Aktivität des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Medium mit Hilfe des Kits "CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay" (Promega, Madison, USA) fluorometrisch bestimmt. Wird die Integrität der Zellmembran gestört, kann die LDH ins umgebende Medium gelangen (Rae, 1977). Die Höhe der LDH-Aktivität im Medium ist somit ein Maß für die Zytotoxizität der Partikel und Stimulantien. Die zytosolische LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, die mit der Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  gekoppelt ist, was einen wichtigen Schritt im Energiestoffwechsel der Zelle darstellt. Im Assay wird die freigesetzte Menge an LDH durch Zugabe von Laktat,  $\text{NAD}^+$  und Resazurin in Anwesenheit des Enzyms Diaphorase bestimmt. Diaphorase katalysiert die irrevesibele Umsetzung des Farbstoffs Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin unter Verbrauch des bei der LDH-Reaktion gebildeten  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Die gemessene Fluoreszenz ist somit proportional zur Menge an LDH im Medium.



**Abb. 2.1:** Funktionsprinzip des LDH-Zytotoxizitätstests. Durch LDH erfolgt die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Das Enzym Diaphorase kann unter Verbrauch von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  den Farbstoff Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin umsetzen.



Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und nur geringfügig abgeändert. Nach Behandlung der RLE-6TN Zellen mit Partikeln bzw. Stimulantien wurden jeweils 200 µl Medium in ein Eppendorfreaktionsgefäß abgenommen und eventuelle Zell- bzw. Partikelreste durch kurzes Zentrifugieren (10000 rpm für 2 min) entfernt. Für die Positivkontrolle (maximale LDH-Konzentration) wurden Zellen für 5 min mit 2 µl Lysepuffer pro 100 µl Medium lysiert. Als Negativkontrolle diente Serum-reduziertes Medium. Jeweils 50 µl Medium von Positivkontrolle, Negativkontrolle und behandelten Zellen wurden in eine 96-well-Platte vorgelegt und mit 50 µl CytoTox-ONE™-Reagenz für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 25 µl Stopp-Lösung beendet. Die fluorometrische Detektion erfolgte mit Hilfe des Fluorometers Fluoroskan Ascent (Labsystems), wobei Absorption und Emission mit der Filterkombination 544/590 nm gemessen wurden. Die Zytotoxizität wurde aus den ermittelten optischen Dichten (OD) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = 100 \times \frac{\text{OD}_{(\text{Medium behandelte Zellen})} - \text{OD}_{(\text{Negativkontrolle})}}{\text{OD}_{(\text{Positivkontrolle})} - \text{OD}_{(\text{Negativkontrolle})}}$$

### 2.2.4 Isolierung von Zellmembranmikrodomänen (Lipid Rafts)

Die Isolierung der Membranmikrodomänen erfolgte durch Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten und wurde leicht verändert nach der von Brown und Rose 1992 beschriebenen Methode durchgeführt (Brown & Rose, 1992).

Die Zellen wurden dazu wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben in 145 cm<sup>2</sup> Kulturschalen ausplattiert und für ca. 18 h auf Serum-reduziertes Medium gesetzt. Nach Behandlung der Zellen mit entsprechenden Partikeln bzw. Stimulantien wurden die Zellen jeweils 1 x mit 2 ml eiskaltem PBS und 1 x mit 2 ml eiskaltem TNE-Puffer gewaschen. Hierbei waren die Kulturschalen immer auf Eis gelagert. Nach Zugabe von je 2 ml TNE-Puffer pro Kulturschale wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 5 min zentrifugiert (2000 rpm bei 4°C). Das Pellet wurde in 1,2 ml TNE-Puffer, der mit 1 % Phosphatase- und 1 % Proteinase- Inhibitor versetzt wurde, resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges

Aufziehen mittels einer 2 ml Spritze (Plastipak™, BD, Franklin Lakes, USA) und Injektionskanüle (25G x 1"- Nr. 18, 0,5mm x 25mm), BD, Franklin Lakes, USA) geschert. Zu 900 µl des entstandenen Homogenats wurden je 100 µl 10 %-iges Triton X-100 pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden 400 µl des Homogenats in ein 6,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 800 µl 60 %-OptiPrep™-Lösung auf eine Endkonzentration von 40 % OptiPrep™-Lösung eingestellt. Darüber wurden vorsichtig 2,1 ml 30 %-OptiPrep™-Lösung in TNE-Puffer geschichtet, gefolgt von 0,9 ml 5 %-OptiPrep™-Lösung in TNE-Puffer. Nach Austarieren der Zentrifugenröhrchen wurden diese in der Ultrazentrifuge bei 4 °C und 40000 rpm für 4 h zentrifugiert. Danach wurden aus dem Zentrifugenröhrchen von oben nach unten 7 Fraktionen von ca. 600 µl Volumen gesammelt, in Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

### TNE-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7,4

150 mM NaCl

2 mM EDTA

### **2.2.5 Dot Blot zum Nachweis von Gangliosid G<sub>M1</sub>**

Zur Bestimmung der Fraktionen, die die Membranmikrodomänen enthalten, wurde der Lipid Raft Marker Gangliosid G<sub>M1</sub> nachgewiesen, ein Lipid, das wie in Kapitel 1 beschrieben, in Lipid Rafts angereichert ist.

Die Untereinheit B des Cholera-Toxins (CTB) bindet selektiv an G<sub>M1</sub> (van Heyningen *et al.*, 1976) und wurde, gekoppelt mit Peroxidase (CTB-HRP, Sigma), zum Nachweis von G<sub>M1</sub> im Dot Blot benutzt. Die hier verwendete Methode wurde leicht verändert nach dem Dot Blot Protokoll von abcam ([www.abcam.com/technical](http://www.abcam.com/technical)) durchgeführt.

Nach der Ultrazentrifugation wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, wurden nacheinander von jeder Fraktion 2 µl auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert, jeweils im Abstand von 1 cm. Nach einer Trocknungsphase von 20 min, wurde die Membran in 5 % Magermilchpulver in PBS gelegt und 30 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran auf Parafilm gelegt und für 1 h bei RT mit 10 ml 5 %

Magermilchpulver/PBS mit CTB-HRP (Verdünnung 1:1000) bedeckt. Nach dieser Inkubationszeit konnte mittels ECL Plus TM Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) die Detektion des Peroxidase-gekoppelten CTB mittels Chemilumineszenz-Reaktion nach Angaben des Herstellers erfolgen. Dazu wurde die Membran 4 x 5 min mit PBS gewaschen, für 5 min mit ECL Plus Western blotting detection reagent inkubiert, und die Chemilumineszenz-Signale auf Röntgenfilm festgehalten.

## 2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.6.1 Zellyse und Proteinextraktion

Zur Herstellung von Proteinextrakten für Western-Blot-Analysen wurden die Zellen nach den einzelnen Behandlungen 1 x mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 x RIPA-Puffer (80 µl für 9,6 cm<sup>2</sup>) lysiert. Dem 1 x RIPA Puffer wurden jeweils 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma) und 1 % Proteinase Inhibitor Cocktail frisch (Calbiochem) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C im Kühlschrank wurden die Lysate in Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Lysate 20 min bei 4°C mit 16.000 rpm zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei 4°C gelagert. .

#### 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

### 2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) wurde der DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Assay basiert auf der Reaktion der Proteine mit einer basischen Kupfer-Tartrat-Lösung und Folin-Reagenz.

Dafür wurden in eine 96-well Platte nacheinander 5 µl Proteinextrakt, 25 µl Lösung A' (20 µl Lösung S pro ml Lösung A) und 200 µl Lösung B pipettiert. Nach 15 min Inkubation bei RT um Dunkeln erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 630 nm. Die Proteinkonzentration ließ sich anhand einer parallel aufgetragenen Eichkurve aus BSA in 1 x RIPA-Puffer errechnen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen (siehe Kapitel 2.2.4) wurde eine Eichkurve aus BSA in TNE-Puffer benutzt.

#### 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).

### 2.2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Laemmli *et al.*, 1970). In entsprechend zusammengesetzten Minigel-Glasplatten wurde dazu ein 1 mm dickes Trenngel (7,5 % oder 10 %, je nach Größe des Proteins) 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 2 x Elektrophorese-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen gegeben. Pro Geltasche wurden 5-10 µg

Protein aufgetragen. Zur Auftrennung der Proteine aus den einzelnen Fraktionen (siehe 2.2.4) wurden diese nach der Proteinbestimmung jeweils mit 210 µl 4 x Elektrophorese-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Von jeder Fraktion wurden 20 µl pro Geltasche aufgetragen. Als Protein-Größenstandard wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 50 V und nach Einlaufen der Lauffront in das Trenngel bei 120 V.

Trenngel:

7,5 % bzw. 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 20 µl TEMED zugegeben.

1 x Elektroden-Laufpuffer:

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

4 x Elektrophorese-Probenpuffer:

240 mM Tris/HCl, pH 6,8  
4 % (w/v) SDS  
40 % (w/v) Saccharose  
2 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
0,2 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Herstellung eines 2 x Elektrophorese-Probenpuffers wurde der 4 x Elektrophorese-Probenpuffer entsprechend mit A. dest. verdünnt.

#### **2.2.6.4 Western Blot Transfer**

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine per Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid; Hybond-P; Amersham Pharmacia Biotech, Pittsburgh, PA) übertragen. Diese wurde für ca. 20 s

in Methanol aktiviert und anschließend 10 min in 4°C kaltem Transferpuffer inkubiert. Auch die Gele wurden für 10 min in 4°C kaltem Transferpuffer äquilibriert.

Für den Transfer wurde der Bio-Rad Criterion™-Blotter nach Angaben des Herstellers verwendet. In einer aufklappbaren Transferkammer wurden nacheinander aufgelegt: eine Lage Plastikwolle, eine Lage Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, eine Lage Filterpapier, eine Lage Plastikwolle. Diese Transferkammer wurde in den mit kaltem Transferpuffer gefüllten Tank derart eingesetzt, dass die Membran-Seite mit der Anoden-Platte übereinstimmte. Der Transfer erfolgte für 1 h (bei größeren Proteinen 1,5 h) bei 60 V unter Rühren (Magnetrührer) und Kühlung.

### Transferpuffer (pH 8,3):

25 mM Tris

192 mM Glycin

10 % (v/v) Methanol

### **2.2.6.5 Immunologischer Proteinnachweis**

Nach dem Western Blot Transfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung freier Protein-Bindungsstellen 1 h in Blockierungslösung (5 % BSA in TBST) bei RT unter Schütteln inkubiert. Die anschließende Inkubation der jeweiligen Primär-Antikörper-Lösung (vergleiche Kapitel 2.1.4) erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Danach wurde die Membran 4 x 5 min mit TBST gewaschen und in der Sekundär-Antikörper-Lösung 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper erfolgte mittels Chemilumineszenz-Reaktion mit dem ECL Plus™ Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien). Dazu wurde die Membran 4 x 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 Tris/HCl, pH 7,6

137 mM NaCl

0,1 % (w/v) Tween 20

### **2.2.6.6 Densitometrische Auswertung**

Die entwickelten Röntgenfilme (vgl. 2.2.6.5) wurden eingescannt und die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte durch densitometrische Auswertung mit Hilfe der Software ImageJ vom Nationalen Gesundheitsinstitut der USA (*US National Institute of Health*; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; Abramoff *et al.*, 2004).

### **2.2.7 Statistik**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal wiederholt, und ergaben reproduzierbare Ergebnisse. Diese werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zum statistischen Vergleich der Ergebnisse wurde der Student's *t*-Test angewendet. Die Differenz von Werten mit  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant beurteilt (Zöfel, 1992).

### **2.2.8 Abbildungen**

Die Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden zur besseren Darstellung digital bearbeitet, sind in ihrem Inhalt jedoch identisch mit den Originaldaten.

### 3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht initiale Ereignisse der durch ultrafeine Partikel induzierten Signaltransduktion in der Lungenepithel-Zelllinie RLE-6TN. Eine Belastung mit verbrennungsgenerierten Modellpartikeln führt über eine Beteiligung der Membranrezeptoren EGF-R und  $\beta$ 1-Integrine zu einer Aktivierung von Akt und Erk1/2 (Sydlik *et al.*, 2006; Unfried *et al.*, 2008). Die Verbindung zwischen Rezeptoren und *downstream* gelegenen Signalproteinen könnte dabei über Membran-assoziierte SFK hergestellt werden. Zudem können diese Kinasen die Aktivität von Membranrezeptoren beeinflussen (Moro *et al.*, 2002). Deshalb untersucht die vorliegende Arbeit die Funktion von SFK bei der partikelinduzierten proliferativen Signaltransduktion in RLE-6TN Zellen. Zum einen wird hier die Auswirkung der Aktivität von SFK auf die Signalproteine Akt und Erk1/2 analysiert, zum anderen die Funktion von SFK bei der Interaktion zwischen den Zelloberflächenrezeptoren EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen.

Da der Membran eine bedeutende Rolle im proliferativen Signalweg zukommt und Signalereignisse hier initiiert werden, liegt der zentrale Aspekt dieser Arbeit in der Untersuchung der Beteiligung von Membranmikrodomänen (Lipid Rafts) als Signalplattformen bei der partikelinduzierten Proliferation. Dabei stand die Lokalisation identifizierter Signalproteine in Lipid Rafts vor und nach Belastung mit Partikeln im Vordergrund.

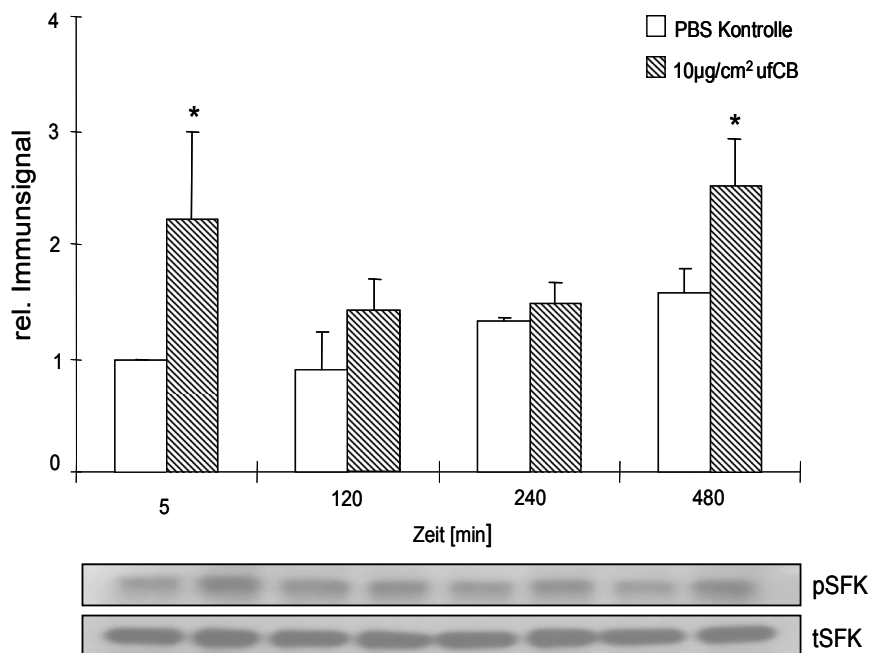
#### 3.1 Induktion der SFK-Aktivierung durch Modellpartikel

Bei der durch ufCB-induzierten Proliferation sind Membran-abhängige Signalereignisse beschrieben worden (Sydlik *et al.*, 2006; Unfried *et al.*, 2008). Dabei induzieren die Partikel eine Aktivierung von Akt und Erk1/2. Die Verbindung zwischen der Membran und der Aktivierung dieser Signalproteine kann über Membran-assoziierte SFK erfolgen, die zudem in proliferative Signalprozesse involviert sind (Roskoski *et al.*, 2004). Im Folgenden wurde analysiert, ob SFK bei der beschriebenen partikelinduzierten Signaltransduktion in RLE-6TN Zellen beteiligt sind. Dazu wurde zunächst der Einfluss von Modellpartikeln auf den Aktivierungsstatus dieser Kinasen untersucht. Die



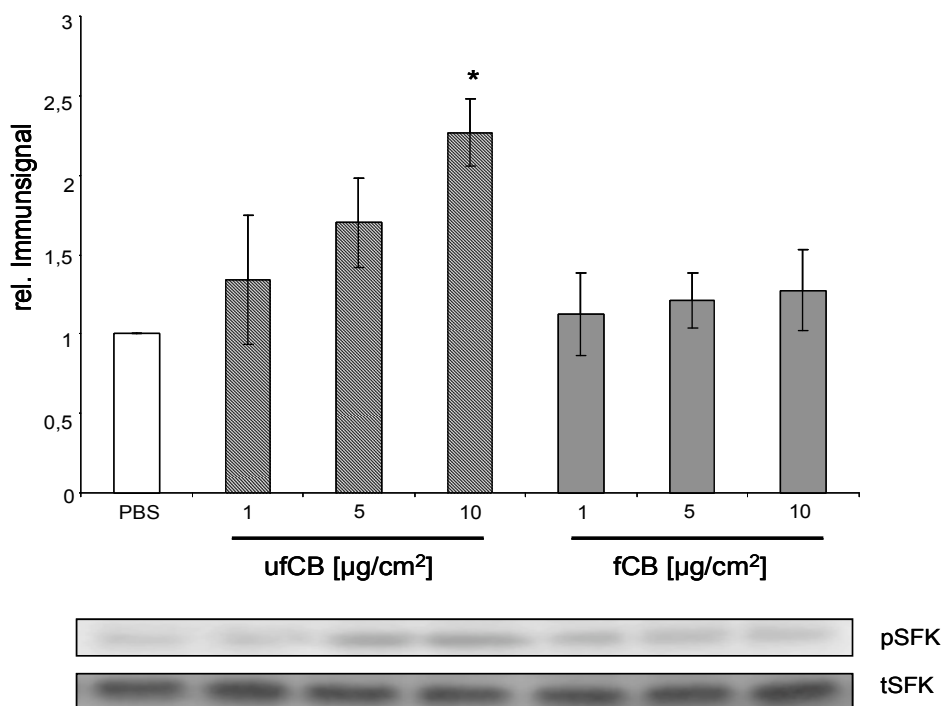
Phosphorylierung von SFK an Tyr<sup>416</sup> gilt dabei als Maß für dessen Aktivierung und wurde im Western Blot nachgewiesen (Roskoski *et al.*, 2004).

RLE-6TN Zellen wurden über einen Zeitraum von 5, 120, 240 und 480 min mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB (Printex<sup>®</sup> 90) behandelt (vgl. 2.2.1.3). In Western-Blot-Analysen ist zu erkennen, dass die Belastung der RLE-6TN Zellen mit ufCB nach 5 min und 480 min eine Phosphorylierung von SFK um den Faktor 2,1 bzw. 1,6 im Vergleich zur Kontrolle induziert (Abb. 3.1). Nach 120 min und 240 min kann dagegen kein Anstieg der Phosphorylierung von SFK im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Mit dem Zeitverlauf der Partikelbelastung erkennt man nach 240 und 480 min einen geringfügigen Anstieg der Phosphorylierung von SFK auch in den Kontrollen, der möglicherweise auf Effekte des Serum-reduzierten Hungermediums zurückzuführen ist. Der Nachweis der Gesamtproteinmenge von SFK (tSFK) diente als Ladekontrolle und zeigte keine durch die Behandlung mit ufCB verursachte Veränderung der Proteinmenge.



**Abb. 3.1: Zeitabhängige Aktivierung von SFK durch die Behandlung mit ufCB:** RLE-6TN Zellen wurden für 5, 120, 240 und 480 min mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-SFK Tyr<sup>416</sup> in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten.\* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen PBS-Kontrolle (p < 0,05).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, ob die gezeigte Aktivierung von SFK abhängig ist von der Größe der Partikel. Dazu wurden RLE-6TN Zellen für 60 min mit 1, 5 und 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  feinem CB (fCB, Huber 990) belastet. Zusätzlich erfolgte für 60 min eine Belastung mit 1, 5 und 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB. Hier kann in Western-Blot-Analysen für alle Konzentrationen an fCB keine Aktivierung von SFK (Tyr<sup>416</sup>) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abb. 3.2). Für die Belastung mit ufCB konnte dagegen bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine Zunahme der Phosphorylierung von SFK beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB konnte ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von SFK gezeigt werden. Der Nachweis der Gesamtproteine für SFK (tSFK) zeigte keine durch die Behandlung mit fCB verursachte Veränderung der Proteinmenge und wurde als Ladekontrolle betrachtet. Somit sind bei gleicher Massendosis nur ultrafeine CB-Partikel in der Lage, eine Aktivierung von SFK in RLE-6TN Zellen zu induzieren.



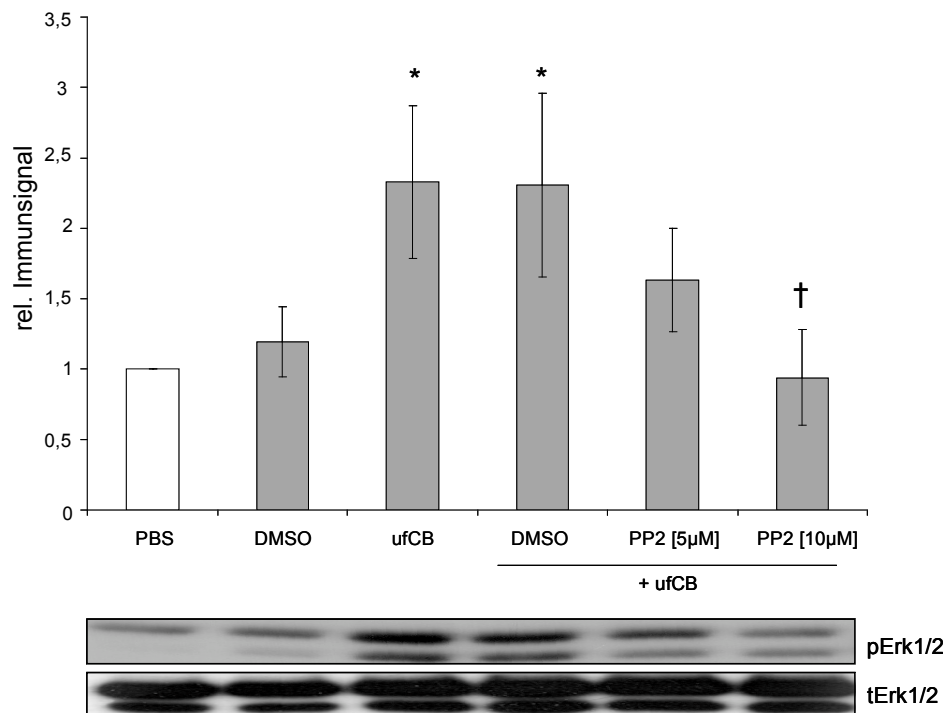
**Abb. 3.2: Aktivierung von SFK abhängig von der Partikelgröße:** RLE-6TN Zellen wurden für 60 min mit 1, 5 oder 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  fCB bzw. ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-SFK Tyr<sup>416</sup> in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten.\* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

### 3.2 Einfluss von SFK auf die Aktivierung von Erk1/2 und Akt

Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, dass eine Belastung von RLE-6TN Zellen mit ufCB eine Akt-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 induziert (Unfried *et al.*, 2008). Nachdem gezeigt werden konnte, dass SFK nach Exposition gegenüber ufCB phosphoryliert werden, sollte in den folgenden Versuchsreihen deren Einfluss auf die Aktivierung von Erk1/2 und Akt analysiert werden. Dazu wurden die SFK mit Hilfe des pharmakologischen Inhibitors PP2 blockiert und 8 h nach Partikelbelastung der Phosphorylierungsstatus beider Signalproteine Erk1/2 und Akt untersucht. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da gezeigt wurde, dass eine Inhibierung der Membranrezeptoren nach 8 h in einer reduzierten Aktivierung von Erk1/2 resultiert (Sydlik *et al.*, 2006).

RLE-6TN Zellen wurden für 1 h mit dem SFK-Inhibitor PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, Hanke *et al.*, 1996) bzw. der dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle DMSO vorinkubiert und anschließend für 8 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB belastet (vgl. 2.2.1.3). Im Anschluss wurde die Phosphorylierung von Erk1/2 und Akt in Western-Blot-Analysen mittels phospho-spezifischer Antikörper untersucht. Zur Inhibierung der SFK wurden 5 bzw. 10 µM PP2 eingesetzt, während die Lösungsmittelkontrolle DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % verwendet wurde.

In Abbildung 3.3 ist zu erkennen, dass die kombinierte Behandlung mit ufCB und DMSO einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von Erk1/2 um den Faktor 2,3 zur PBS Kontrolle induziert. Eine Vorinkubation mit 5 µM PP2 zeigt zwar eine Reduktion der Aktivierung von Erk1/2; diese ist aber nicht signifikant. Eine Vorbehandlung mit 10 µM PP2 dagegen bewirkt eine signifikante Reduktion der durch ufCB-induzierten Phosphorylierung von Erk1/2 auf Kontrollniveau. Dieses Ergebnis impliziert eine Dosisabhängigkeit des gezeigten Effektes von PP2. Die Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von Erk1/2. Der Nachweis der Gesamtproteinmenge von Erk1/2 (tErk1/2) zeigte keine durch die Behandlung mit ufCB verursachte Veränderung der Proteinmenge und wurde als Ladekontrolle benutzt.

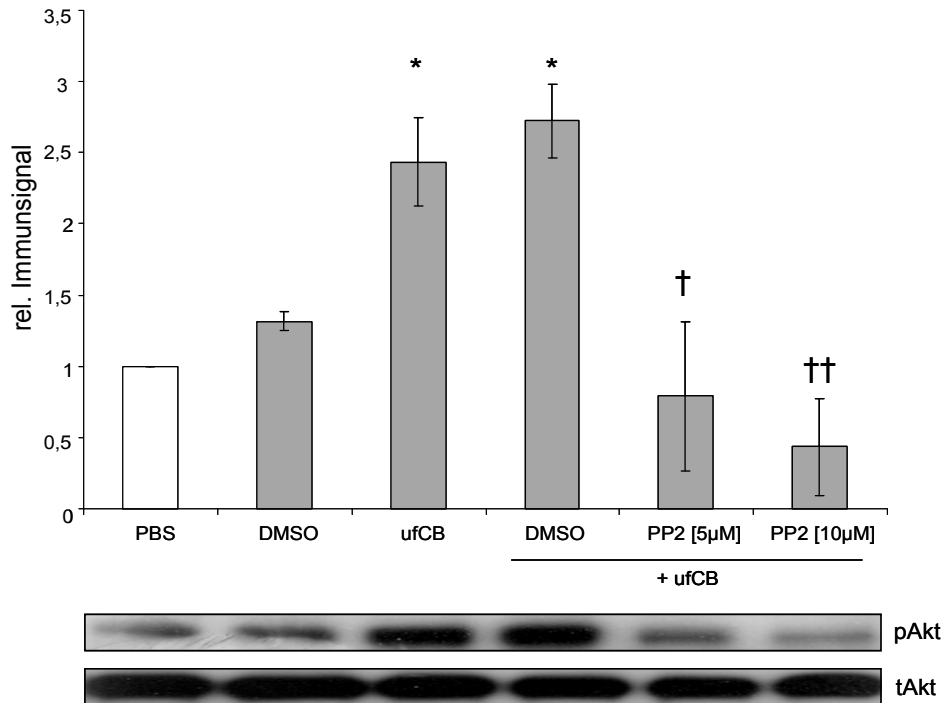


**Abb. 3.3: SFK-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2:** RLE-6TN Zellen wurden für 1 h mit 5 oder 10 µM SFK-Inhibitor PP2 vorinkubiert bzw. mit der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle DMSO [Endkonzentration 0,1 %] und danach für 8 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-Erk1/2 in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Gesamtproteine von Erk1/2 (tErk1/2) diente als Ladekontrolle.\* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zur Behandlung mit DMSO + ufCB (p < 0,05).

Im selben Experiment zeigt die Phosphorylierung von Akt eine signifikante Zunahme um den Faktor 2,7 zur PBS Kontrolle, nachdem die Zellen mit ufCB in Kombination mit DMSO belastet wurden (Abb. 3.4).

Nach einer 1-stündigen Vorbehandlung mit PP2 bei einer Endkonzentration von 5 µM wurde eine Reduktion der durch ufCB-induzierten Phosphorylierung von Akt auf Kontrollniveau detektiert. Bei einer Endkonzentration von 10 µM PP2 zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Aktivierung von Akt auf Kontrolllevel. Auch hier hat die Behandlung mit DMSO keinen Einfluss auf die Aktivierung von Akt. Der Nachweis der

Gesamtproteinmenge von Akt (tAkt) zeigte keine durch die Behandlung mit ufCB verursachte Veränderung der Proteinmenge und wurde als Ladekontrolle betrachtet.



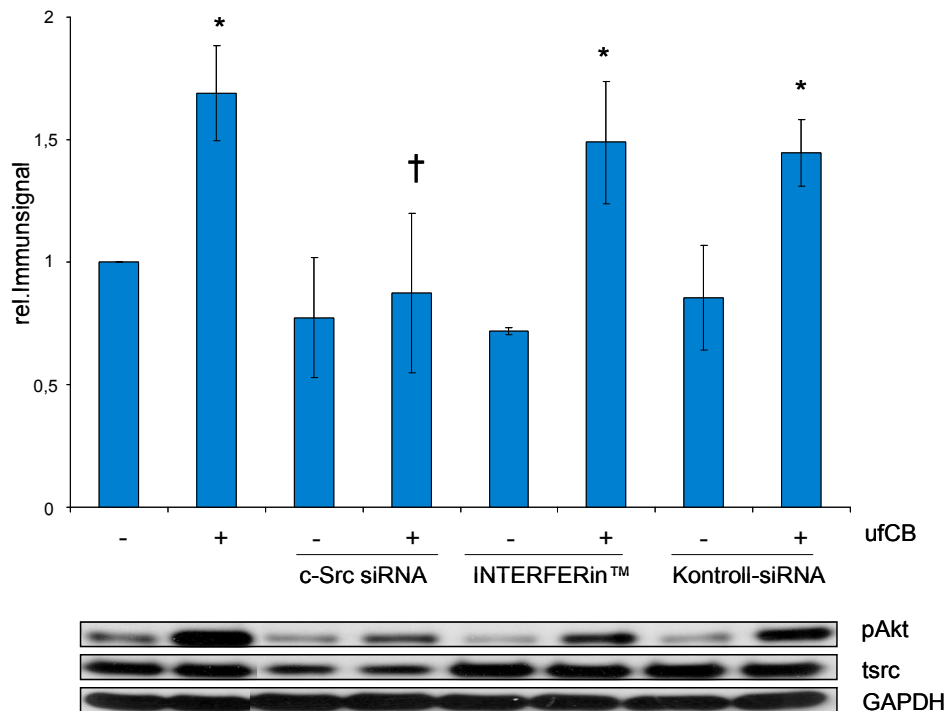
**Abb. 3.4: SFK-abhängige Aktivierung von Akt:** RLE-6TN Zellen wurden für 1 h mit 5 oder 10 µM SFK-Inhibitor PP2 vorinkubiert bzw. mit der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle DMSO [Endkonzentration 0,1 %] und danach für 8 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-Akt in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Gesamtproteine von Akt (tAkt) diente als Ladekontrolle.\* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zur Behandlung mit DMSO + ufCB ( $p < 0,01$ ); †† signifikant unterschiedlich zur Behandlung mit DMSO + ufCB ( $p < 0,001$ ).

### 3.3 Einfluss von c-Src auf die Aktivierung von Akt

Die SFK konnten als wesentlicher Bestandteil der partikelinduzierten Signaltransduktion identifiziert werden, die *upstream* von Akt und Erk1/2 lokalisiert sind. Die Familie der SFK umfasst mehrere Mitglieder, wobei c-Src in allen Zellen exprimiert wird (Thomas & Brugge, 1997; Rucci *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, ob c-Src an der partikelinduzierten Signaltransduktion in RLE-6TN Zellen beteiligt ist, wurde die

Expression dieser Kinase durch Transfektion von c-Src-spezifischer siRNA verringert. Da bereits von Unfried *et al.* (2008) gezeigt werden konnte, dass ufCB eine Akt-abhängige Aktivierung von Erk1/2 induziert, wurde im Folgenden der Einfluss der c-Src-spezifischen siRNA auch nur auf die Aktivierung von Akt untersucht. Zu diesem Zweck wurden RLE-6TN Zellen, 24 h nachdem die Zellen ausplattiert wurden, mit 100 nM c-Src-spezifischer siRNA bzw. 100 nM Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert (vgl. 2.2.2). Zudem wurde in einem Ansatz als zusätzliche Kontrolle INTERFERin™-Transfektionsreagenz ohne siRNA verwendet, um einen Einfluss des Reagenz auf den Phosphoryierungsstatus des untersuchten Signalproteins auszuschließen. 48 h nach der Transfektion wurden die RLE-6TN Zellen für 8 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB behandelt und anschließend die Aktivierung von Akt mittels phospho-spezifischer Antikörper im Western Blot untersucht.

Eine Belastung mit ufCB induziert einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von Akt um den Faktor 1,7 zur PBS Kontrolle (Abb. 3.5). Die Transfektion mit c-Src-spezifischer siRNA resultierte in einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von Akt auf Kontrollniveau. Die Transfektion mit Negativ-Kontroll-siRNA hatte dagegen keinen Einfluss auf die Aktivierung von Akt. Das Transfektionsreagenz INTERFERin™ zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die Aktivierung von Akt. Um sicherzustellen, dass ein *knockdown* auf Ebene der SFK stattgefunden hat, wurden die Gesamtproteine für SFK (tSFK) detektiert. Hier zeigte sich im Western Blot eine deutliche Reduktion der Bandenintensität nur in den mit c-Src-spezifischer siRNA transfizierten RLE-6TN Zellen. Bei den mit Negativ-Kontroll-siRNA behandelten Zellen sowie mit Transfektionsreagenz ohne siRNA behandelten Zellen konnte kein Unterschied in der Bandenintensität von SFK im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen beobachtet werden. Die Detektion der Gesamtproteinmenge für GAPDH zeigte keine durch die Belastung oder Transfektion verursachte Veränderung der Proteinmenge und diente hier als Ladekontrolle.



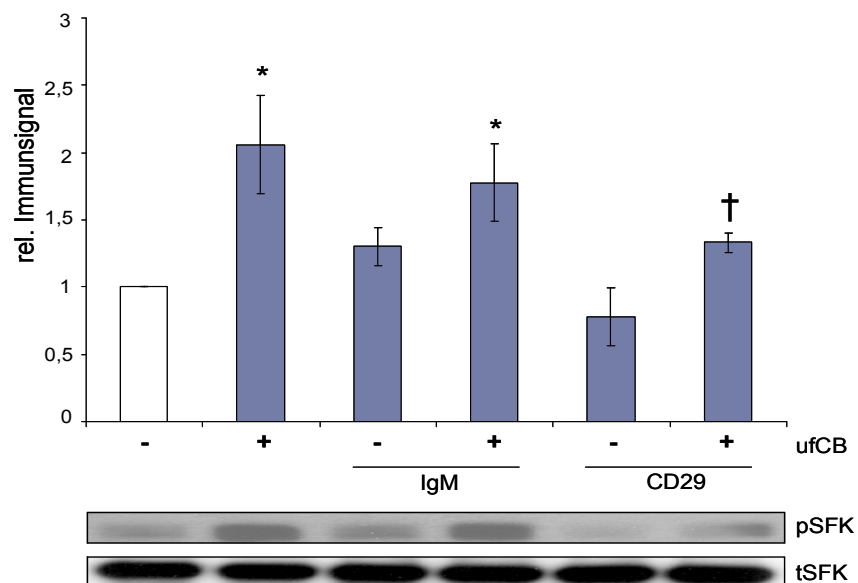
**Abb. 3.5: c-Src-abhängige Aktivierung von Akt:** RLE-6TN Zellen wurden mit 100 nM c-Src-spezifischer siRNA bzw. Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert oder mit INTERFERin™ ohne siRNA als Transfektionsreagenz-Kontrolle behandelt. 48 h später wurden die Zellen für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-Akt in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Gesamtproteine von GAPDH fungierte als Ladekontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine für SFK (tSFK) diente zur Überprüfung des *knockdowns* von SFK (gezeigt sind jeweils repräsentative Western Blots). \* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zur Behandlung mit ufCB ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Untersuchung der Interaktion zwischen Membranrezeptoren

Auf Membranebene sind EGF-R und  $\beta$ 1-Integrine an der durch ufCB-induzierten Proliferation in RLE-6TN Zellen beteiligt (Sydlik *et al.*, 2006). Wie die Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren vermittelt wird, ist noch nicht geklärt. Hier könnten SFK eine Rolle spielen, da beschrieben ist, dass sie die Aktivität von Integrinen und des EGF-R beeinflussen können (Thomas & Brugge, 1997; Parsons & Parsons, 2004). Zudem ist c-Src bei der Zelladhäsion im Komplex mit Integrinen an der Aktivierung des EGF-R beteiligt (Moro *et al.*, 2002).

In den folgenden Versuchsreihen wurde die Rolle von SFK als Signalvermittler zwischen EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen untersucht. Dazu wurde analysiert, ob eine Inhibierung der Membranrezeptoren einen Einfluss auf die partikelinduzierte Aktivierung von SFK hat.

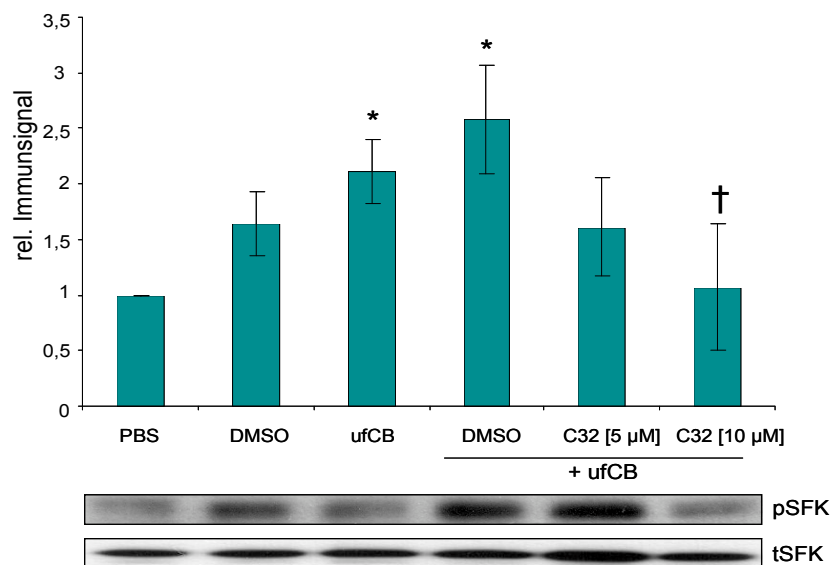
Für die Durchführung dieses Versuches wurden RLE-6TN Zellen für 1 h mit dem  $\beta$ 1-Integrin-blockierenden Antikörper CD29 bzw. der Antikörperkontrolle IgM vorinkubiert und anschließend für 8 h mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Beide Antikörper wurden in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt (vgl. 2.1.3). Im Western Blot wurde anschließend die Phosphorylierung von SFK (Tyr<sup>416</sup>) überprüft. Die Belastung der Zellen mit ufCB induziert einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von SFK um den Faktor 2,1 zur PBS Kontrolle (Abb. 3.6). Die Vorbehandlung mit dem Integrin-blockierenden Antikörper CD29 führte zu einer signifikanten Abnahme der durch ufCB-induzieren Phosphorylierung von SFK. Bei den mit der Antikörperkontrolle IgM vorbehandelten Zellen sieht man keine signifikante Verringerung der Phosphorylierung von SFK.



**Abb. 3.6: Einfluss von  $\beta$ 1-Integrinen auf die Aktivierung von SFK:** RLE-6TN Zellen wurden für 1 h mit  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD29 bzw. Antikörperkontrolle IgM vorinkubiert und für 8 h mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-SFK (Tyr<sup>416</sup>) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Gesamtproteine von SFK (tSFK) diene als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zur Behandlung mit ufCB ( $p < 0,05$ ).



In einem zweiten Versuchsansatz wurden die RLE-6TN Zellen für 1 h mit 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  des pharmakologischen Inhibitors für den EGF-R, Compound 32 (vgl. 2.1.3), oder der dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle DMSO [Endkonzentration 0,1 %] vorinkubiert. Die Belastung der Zellen erfolgte für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB. Im Western Blot wurde anschließend die Phosphorylierung von SFK (Tyr<sup>416</sup>) analysiert. Die kombinierte Behandlung mit ufCB und DMSO induziert einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von SFK um den Faktor 2,5 zur PBS Kontrolle (Abb. 3.7). Eine Vorinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Compound 32 resultierte in einer signifikanten Abnahme der partikelinduzierten Phosphorylierung von SFK auf Kontrollniveau. Bei der niedrigeren Inhibitorkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  zeigte sich eine Verringerung der Phosphorylierung von SFK, die jedoch nicht signifikant ist. Der Nachweis der Gesamtproteinmenge von SFK (tSFK) zeigte in beiden Fällen keine durch die Behandlung mit ufCB verursachte Veränderung der Proteinmenge und wurde als Ladekontrolle betrachtet. Die SFK können somit *downstream* der beteiligten Membranrezeptoren lokalisiert werden.

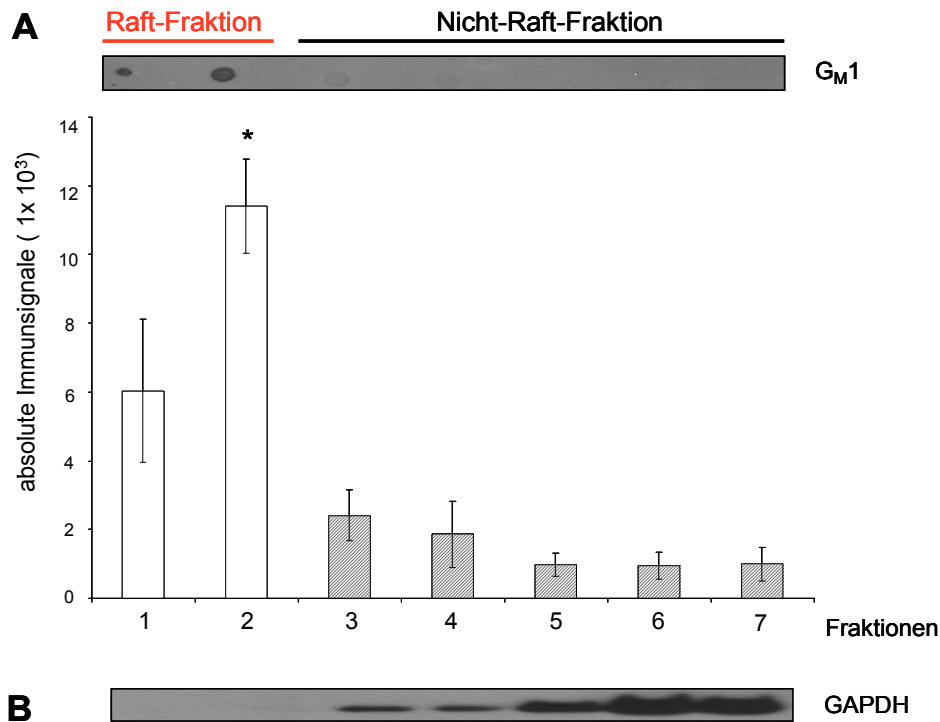


**Abb. 3.7: Einfluss des EGF-R auf die Aktivierung von SFK:** RLE-6TN Zellen wurden für 1 h mit 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Compound 32 (C32) oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO [Endkonzentration 0,1 %] vorinkubiert und anschließend für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-SFK (Tyr<sup>416</sup>) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Gesamtproteine von SFK (tSFK) diente als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; † signifikant unterschiedlich zur Behandlung mit DMSO + ufCB ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Einfluss von ufCB auf die Lokalisation von SFK in Lipid Rafts

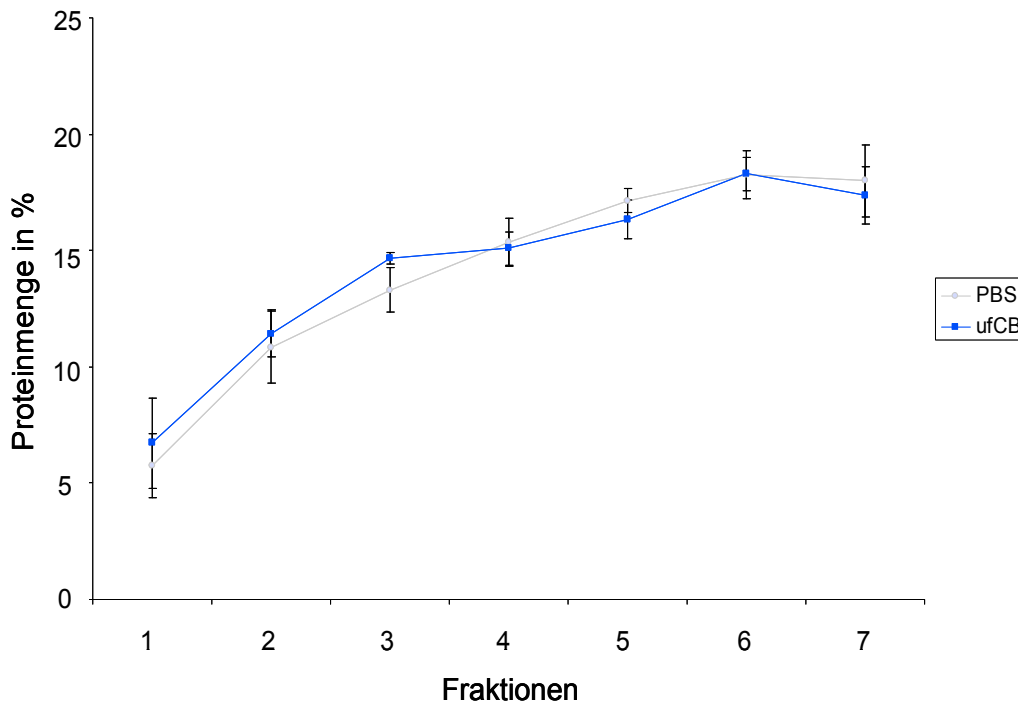
Mit den bisher dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass SFK ein essentieller Bestandteil der partikelinduzierten proliferativen Signaltransduktions-Kette in RLE-6TN Zellen sind. Diese Kinasen sind über *N*-Myristoylierung mit der Membran assoziiert und können in Membranmikrodomänen (Lipid Rafts) angereichert gefunden werden (Song *et al.*, 1997). Diese Lipid Rafts sind als Plattformen bei der Initiation von Signalprozessen beteiligt (vgl. 1.5).

Aufgrund dieser Hinweise aus der Literatur und den bisher gewonnenen Ergebnissen wurde hier untersucht, ob SFK in RLE-6TN Zellen in Lipid Rafts lokalisiert sind und ob eine Behandlung mit ufCB einen Einfluss auf diese Lokalisation hat. Dafür wurden unbehandelte Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert und Detergenz-resistente Membranen (in dieser Arbeit durchgehend als Lipid Rafts bezeichnet) anschließend über OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert (vgl. 2.2.4). Nach der Zentrifugation können 7 Fraktionen zu je 600 µl geerntet werden, die sich in ihrer Dichte unterscheiden. Um diejenigen Fraktionen identifizieren zu können, die Lipid Rafts enthalten, wurde im Dot Blot der Raft-Marker Gangliosid G<sub>M</sub>1 nachgewiesen. Die Untereinheit B des Cholera-Toxins, hier in gekoppelter Form mit Peroxidase, bindet selektiv an G<sub>M</sub>1 und kann deshalb zu dessen Nachweis benutzt werden (vgl. 2.2.5). Wie in Abbildung 3.8 A zu sehen ist, kann in unbehandelten RLE-6TN Zellen der Lipid Raft Marker G<sub>M</sub>1 in den Fraktionen 1 und 2 nachgewiesen werden. Diese Fraktionen wurden im Folgenden als Raft-Fraktion bezeichnet. Der Gehalt an G<sub>M</sub>1 in Fraktion 2 ist dabei signifikant höher als in den Fraktionen 3 bis 7. In Western-Blot-Analysen konnte das Protein GAPDH, das nicht mit Lipid Rafts assoziiert ist (Ramseger *et al.*, 2009), nur in Fraktion 3 bis 7 nachgewiesen werden (Abb. 3.8 B). Diese Fraktionen wurden deshalb als Nicht-Raft-Fraktion bezeichnet.



**Abb. 3.8: Identifikation der Raft-Fraktion in unbehandelten RLE-6TN Zellen:** RLE-6TN Zellen wurden mit 1 % Triton X-100 lysiert und über einen OptiPrep™-Gradienten konnten mittels Ultrazentrifugation Lipid Rafts isoliert werden. **A.** Im Dot Blot erfolgte die Untersuchung der 7 Fraktionen auf den Gehalt an Raft-Marker Gangliosid G<sub>M</sub>1 mit Hilfe der Untereinheit von Cholera-Toxin, gekoppelt mit Peroxidase. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Immunsignalintensität von G<sub>M</sub>1 von drei unabhängigen Experimenten. **B.** Repräsentativer Western Blot für den Nachweis des Nicht-Raft-Markers GAPDH in den einzelnen Fraktionen nach Ultrazentrifugation über einen OptiPrep™-Gradienten.\* signifikant unterschiedlich zu Fraktion 3 bis 7 ( $p < 0,001$ ).

Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde mittels DC Protein Assay Kit bestimmt (vgl. 2.2.6.2). Hier zeigt sich in unbehandelten Zellen, dass die Proteinmenge von Fraktion 1 bis Fraktion 7 kontinuierlich ansteigt (Abb. 3.9). In Fraktion 1 sind durchschnittlich ca. 6 % Protein enthalten; in Fraktion 7 durchschnittlich ca. 18 % Protein. Diese Proteinverteilung wurde auch nicht nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Substanzen und Partikeln verändert. Dies ist in Abb. 3.9 exemplarisch für die Belastung mit ufCB dargestellt.



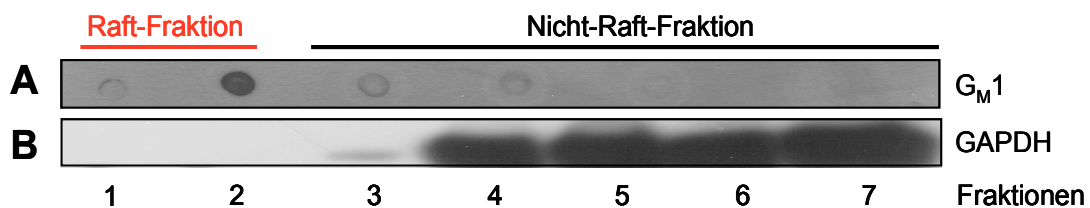
**Abb. 3.9: Bestimmung des Proteingehaltes der einzelnen Fraktionen nach Ultrazentrifugation:** Unbehandelte oder für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastete RLE-6TN Zellen wurden mit 1 % Triton X-100 lysiert und über einen OptiPrep™-Gradienten konnten mittels Ultrazentrifugation Lipid Rafts isoliert werden. Die Proteinbestimmung jeder Fraktion erfolgte anschließend mittels DC Protein Assay Kit. Dargestellt ist der Mittelwert der Proteinmenge jeder Fraktion in % von drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

Unveröffentlichte Arbeiten zeigen, dass eine Belastung von RLE-6TN Zellen für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB eine Veränderung der Lipidzusammensetzung in Mikrodomänen induziert (Arbeiten von Dr. Grether-Beck, AG Zellbiologie, IUF). Darum wurde im Folgenden untersucht, ob eine Behandlung mit ufCB zum Zeitpunkt 5 min auch einen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung der Lipid Rafts hat.

Für alle Versuche zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Lipid Rafts wurde nach densitometrischer Auswertung der Immunsignalintensitäten von SFK oder EGF-R in Western-Blot-Analysen folgendermaßen verfahren: der Mittelwert der Summe der absoluten Signalintensitäten der Raft-Fraktion (1-2)  $\pm$  Standardabweichung wurde im Vergleich zum Mittelwert der Summe der absoluten Signalintensitäten der Nicht-Raft-Fraktion (3-7)  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die absoluten

Signalintensitäten wurden vor der Summierung jeweils auf die Proteinmenge (in %) bezogen, die von jeder Fraktion ermittelt wurde (vgl. Abb. 3.9).

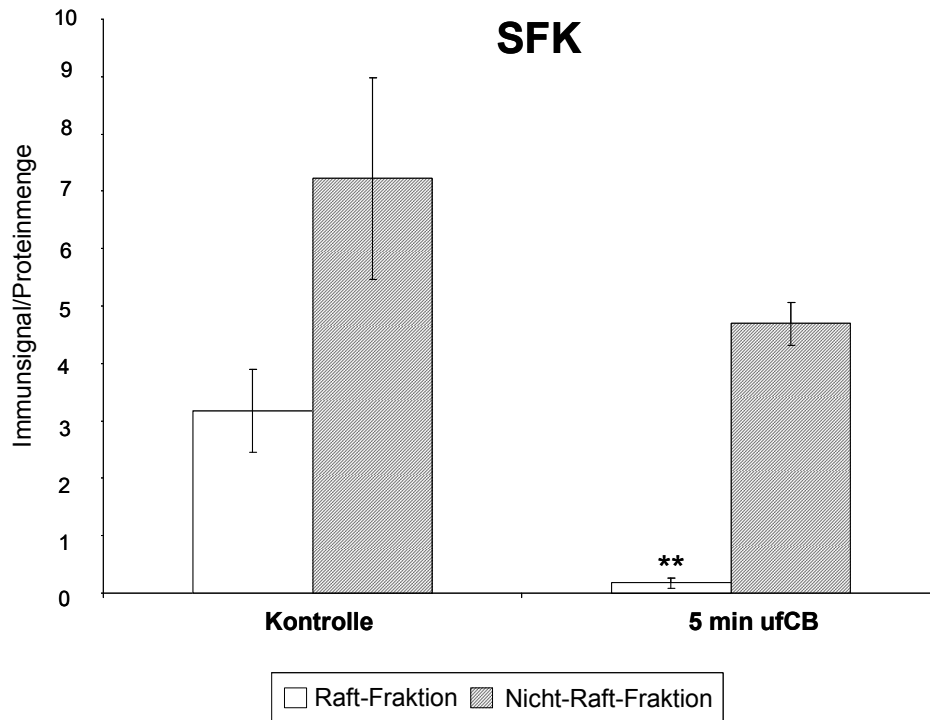
Um zu überprüfen, ob nach der Behandlung mit ufCB die Lipid-Raft Fraktion ebenfalls in Fraktion 1 und 2 lokalisiert werden kann, wurden die RLE-6TN Zellen für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB behandelt und mit 1 % Triton X-100 lysiert. Nachfolgend wurden die Lipid Rafts über OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert (vgl. 2.2.4). Hier zeigte sich nach Untersuchung der einzelnen Fraktionen im Dot Blot für Gangliosid  $G_M1$  das gleiche Bild wie in unbehandelten Zellen; Fraktion 1 und 2 entsprechen auch hier der Raft-Fraktion (Abb. 3.10 A). Aus diesen Ergebnissen sowie der unveränderten Proteinverteilung nach ufCB-Applikation zeigt sich, dass die Raft-Fraktion nach Behandlung mit Partikeln nicht zerstört wird. Das Protein GAPDH ist, wie auch in unbehandelten Zellen, nur in der Nicht-Raft-Fraktion angereichert (Abb. 3.10 B).



**Abb. 3.10: Identifikation der Raft-Fraktion in mit ufCB behandelten RLE-6TN Zellen:** RLE-6TN Zellen wurden für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet und mit 1 % Triton X-100 lysiert. Anschließend wurden Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert. **A.** Dargestellt ist ein repräsentativer Dot Blot, der die Verteilung des Raft-Markers Gangliosid  $G_M1$  in den 7 Fraktionen zeigt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der Untereinheit B von Cholera-Toxin, gekoppelt mit Peroxidase. **B.** Repräsentativer Western Blot für den Nachweis des Nicht-Raft-Markers GAPDH nach Lyse der RLE-6TN Zellen mit 1% Triton X-100 und nachfolgender Fraktionierung über einen OptiPrep™-Gradienten.

Um nun auf Proteinebene zu überprüfen, ob SFK in der identifizierten Raft-Fraktion gefunden werden kann, wurden Western-Blot-Analysen zum Nachweis des Gesamtproteins für SFK durchgeführt. Es zeigte sich, dass 30 % des gesamten Gehalts an SFK in der Raft-Fraktion (1-2) gefunden werden kann (Abb. 3.11). Der Rest befindet sich in der Nicht-Raft-Fraktion (3-7). Nach einer Behandlung der RLE-6TN Zellen für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB konnte eine signifikante Verringerung des Gehalts von SFK in

der Raft-Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Der Gehalt an SFK in der Raft-Fraktion beträgt nach Partikelbelastung nur noch 3 %.

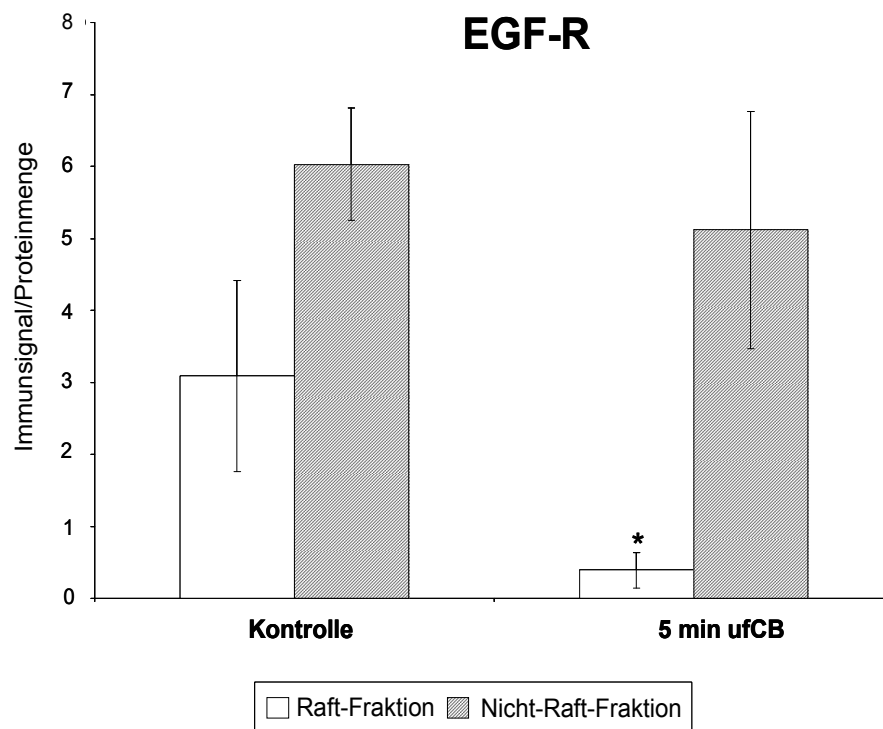


**Abb. 3.11: Einfluss von ufCB auf die Lokalisation von SFK in Lipid Rafts:** RLE-6TN Zellen wurden entweder nicht behandelt oder für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Anschließend erfolgte eine Lyse mit 1 % Triton X-100, wonach die Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Gesamtproteine SFK (tSFK) in den einzelnen Fraktionen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. \*\*signifikant unterschiedlich zur Raft-Fraktion der unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

### 3.6 Auswirkung von ufCB auf die Lokalisation von EGF-R in Lipid Rafts

Auch der EGF-R, der bei der proliferativen Signaltransduktion in RLE-6TN Zellen eine entscheidende Rolle spielt, kann in verschiedenen Zelltypen in Lipid Rafts lokalisiert werden (Mineo *et al.*, 1999; Roepstorff *et al.*, 2002).

Um zu untersuchen, ob der EGF-R in RLE-6TN Zellen in diesen Mikrodomänen gefunden werden kann, wurden unbehandelte Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert und die Lipid Rafts anschließend über OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert (vgl. 2.2.4). In Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass 34 % des Gesamtgehaltes an EGF-R in der Raft-Fraktion lokalisiert ist (Abb. 3.12). Der Rest befindet sich in der Nicht-Raft-Fraktion. Es wurde nun überprüft, ob eine Belastung der RLE-6TN Zellen für 5 min mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB ebenfalls zu einer Translokation des EGF-R aus der Raft-Fraktion führt, wie das für SFK nach Partikelbelastung gezeigt wurde (vgl. Abb. 3.11). Die Belastung der RLE-6TN Zellen mit ufCB induziert eine signifikante Verringerung des Gehalts von EGF-R in der Raft-Fraktion. Nach der Partikelbelastung sind nur noch 7 % des Gesamtgehaltes an EGF-R in der Raft-Fraktion nachweisbar (Abb. 3.12).



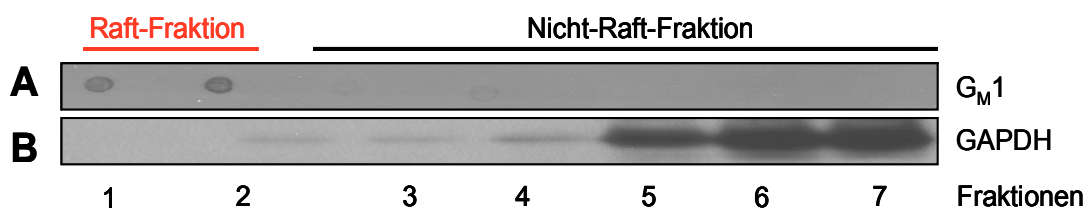
**Abb. 3.12: Einfluss von ufCB auf die Lokalisation von EGF-R in Lipid Rafts:** RLE-6TN Zellen wurden entweder nicht behandelt oder für 5 min mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Anschließend erfolgte eine Lyse mit 1 % Triton X-100, wonach die Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Gesamtproteine EGF-R (tEGF-R) in den einzelnen Fraktionen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. \*signifikant unterschiedlich zur Raft-Fraktion der unbehandelten Kontrolle (p < 0,05).

### 3.7 Abhängigkeit der Translokation von SFK und EGF-R von der Partikelgröße

Es konnte in RLE-6TN Zellen beobachtet werden, dass spezifisch ultrafeines CB mit einem Durchmesser von 14 nm Proliferation induziert. Feines CB mit einem Durchmesser von 260 nm dagegen zeigt keinen Effekt auf diesen Endpunkt (Sydlik *et al.*, 2006). Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass nur ultrafeines CB und nicht feines CB die SFK aktiviert.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Verringerung des Gehaltes an SFK und EGF-R in der Raft-Fraktion hier ebenfalls abhängig ist von der Größe der eingesetzten Partikel, wurden die RLE-6TN Zellen im Folgenden für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  feinem Carbon Black belastet (vgl. 2.1.6). Nach Behandlung konnten Lipid Rafts isoliert werden (vgl. 2.2.4).

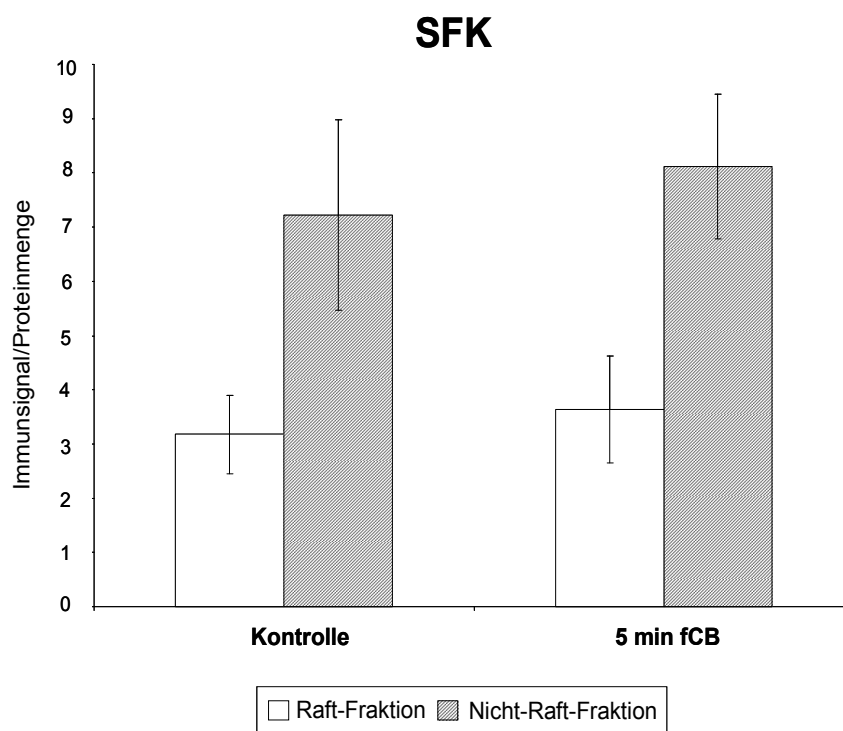
Zunächst wurde überprüft, ob nach einer Behandlung mit fCB die Lipid Rafts in Fraktion 1 und 2 nachgewiesen werden können, wie das für unbehandelte Zellen gezeigt wurde. Auch nach einer Belastung mit feinem CB kann der Raft-Marker  $G_M1$  im Dot Blot hauptsächlich in der 1. und 2. Fraktion gefunden werden (Abb. 3.13 A). In Western-Blot-Analysen konnte GAPDH dagegen nur in der Nicht-Raft-Fraktion detektiert werden. (Abb. 3.13 B)



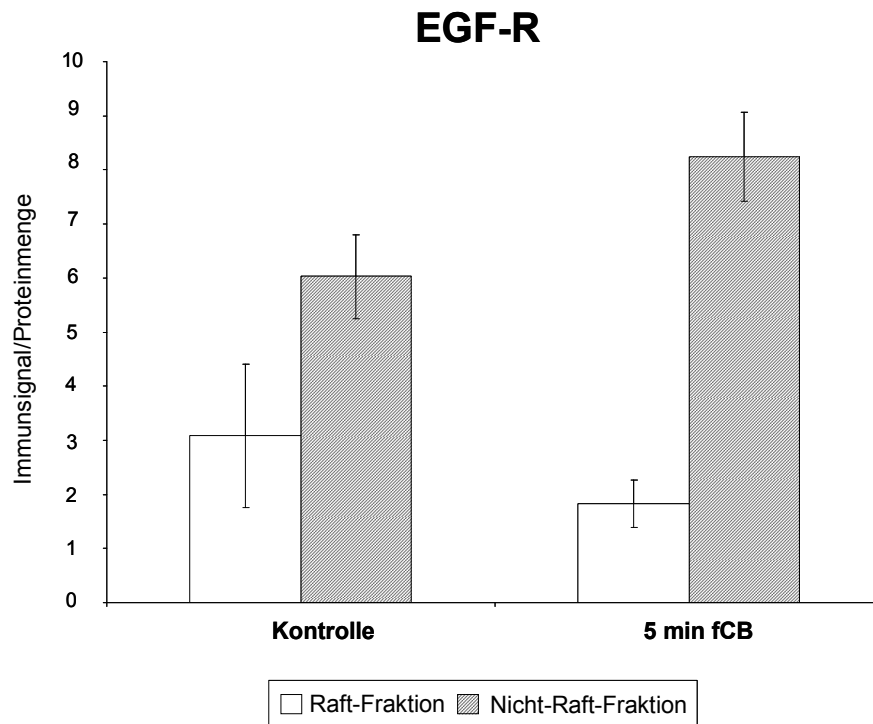
**Abb. 3.13: Identifikation der Raft-Fraktion in mit feinem CB behandelten RLE-6TN Zellen:** RLE-6TN Zellen wurden für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  feinem Carbon Black belastet und mit 1 % Triton X-100 lysiert. Anschließend wurden Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert. **A.** Dargestellt ist ein repräsentativer Dot Blot, der die Verteilung des Raft-Marker Gangliosid  $G_M1$  in den 7 Fraktionen zeigt. Dessen Nachweis erfolgte mit Hilfe der Untereinheit B von Cholera-Toxin, die mit Peroxidase gekoppelt ist. **B.** Repräsentativer Western Blot für den Nicht-Raft-Marker GAPDH nach Lyse der RLE-6TN Zellen mit 1% Triton X-100 und nachfolgender Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation über einen OptiPrep™-Gradienten.



In Western-Blot-Analysen konnte nach einer Behandlung mit feinem CB keine Veränderung des Gesamtgehaltes von SFK in der Raft-Fraktion detektiert werden (Abb. 3.14). Auch hier sind 30 % der SFK in dieser Fraktion lokalisiert. Derselbe Anteil wurde auch in unbehandelten Zellen in der Raft-Fraktion identifiziert (vgl. 3.5). Des Weiteren zeigt sich nach Belastung mit feinem CB nur eine geringfügige, aber keine signifikante Verringerung des Gehaltes an EGF-R in der Raft-Fraktion im Gegensatz zu unbehandelten Zellen (Abb. 3.15).



**Abb. 3.14: Raft-Lokalisation von SFK nach Belastung mit feinem CB:** RLE-6TN Zellen wurden entweder nicht behandelt oder für 5 min mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  fCB belastet. Anschließend erfolgte eine Lyse mit 1 % Triton X-100, wonach Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Gesamtproteine SFK (tSFK) in den einzelnen Fraktionen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 3.15: Raft-Lokalisation von EGF-R nach Belastung mit feinem CB:** RLE-6TN Zellen wurden entweder nicht behandelt oder für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  fCB belastet. Anschließend erfolgte eine Lyse mit 1 % Triton X-100, wonach Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Gesamtproteine EGF-R in den einzelnen Fraktionen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen.

### 3.8 Effekte von Lipidmediatoren auf die Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit ufCB in RLE-6TN Zellen eine Verringerung des Gehaltes von SFK und EGF-R in der Raft-Fraktion bewirkt. Unveröffentlichte Arbeiten zeigen zudem, dass 5 min nach Belastung mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB die Menge an Lipidmediator Ceramid in den Lipid Rafts signifikant ansteigt. Gleichzeitig nimmt der Gehalt von Cholesterol, Sphingomyelin und Gangliosid  $\text{G}_{\text{M}3}$  ab. (Arbeiten von Dr. Grether-Beck, AG Zellbiologie, IUF). Ceramide können als sogenannte bioaktive Sphingolipide in Signalprozesse involviert sein (Hannun & Luberto, 2001). Da der Ceramid-Gehalt nach 5 min Partikelbelastung zunimmt und gleichzeitig zu diesem Zeitpunkt eine Translokation von SFK und EGF-R aus der Raft-Fraktion beobachtet

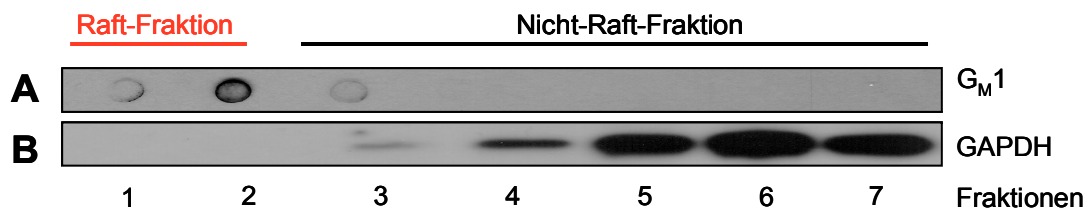
wurde, sollte hier untersucht werden, ob eine externe Zugabe von C<sub>6</sub>-Ceramid (D-erythro-Sphingosine, N-Hexanoyl) die Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid-Raft-Fraktionen beeinflusst. Um auszuschließen, dass die eingesetzte Konzentration von C<sub>6</sub>-Ceramid zytotoxisch ist, wurde die Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt. Die Freisetzung des zytosolischen Enzyms LDH ins Kulturmedium wird als ein Parameter zur Überprüfung der Membranschädigung benutzt. Die Zunahme der LDH-Aktivität ist dementsprechend mit einer erhöhten Zytotoxizität gleichzusetzen (vgl. 2.2.3). Eine 15-minütige Behandlung mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid zeigte keine zytotoxischen Effekte im Vergleich zur PBS-Kontrolle (Tab. 3.16). Auch die in dieser Arbeit verwendeten Partikel hatten keinen Einfluss auf die Membranintegrität der RLE-6TN Zellen. Die eingesetzten Konzentrationen von C<sub>6</sub>-Ceramid und Partikeln schädigen die Zellmembran nicht. Die Zytotoxizität liegt nach allen hier vorgenommenen Behandlungen jeweils bei unter 1 % bezogen auf die maximale LDH-Aktivität nach Lyse der Zellen mit 1 % Triton X-100 (Positivkontrolle, 100 % Zytotoxizität) und damit im Bereich der Kontrolle (Tab. 3.16).

<b>Behandlung</b>	<b>Zytotoxizität in % ( ± Standardabweichung)</b>
Kontrolle PBS	0,44 ± 0,20
10 µM C <sub>6</sub> -Ceramid	0,44 ± 0,26
10 µg/cm <sup>2</sup> fCB	0,45 ± 0,26
10 µg/cm <sup>2</sup> ufCB	0,32 ± 0,21

**Tab. 3.16: Zytotoxizität nach Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid und Partikeln:** RLE-6TN Zellen wurden für 5 min mit PBS, für 15 min mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid oder für 5 min mit 10 µg/cm<sup>2</sup> fCB bzw. ufCB behandelt. Die Aktivität der LDH wurde fluorometrisch mit Hilfe des CytoTox-ONE™ Kits (Promega) im Zellmedium bestimmt. Die gemessenen optischen Dichten (OD) wurden auf die OD der Positivkontrolle, d. h. auf mit Triton X-100 lysierte Zellen, bezogen (maximale LDH-Aktivität) und in Prozent ± Standardabweichung angegeben (n=3).

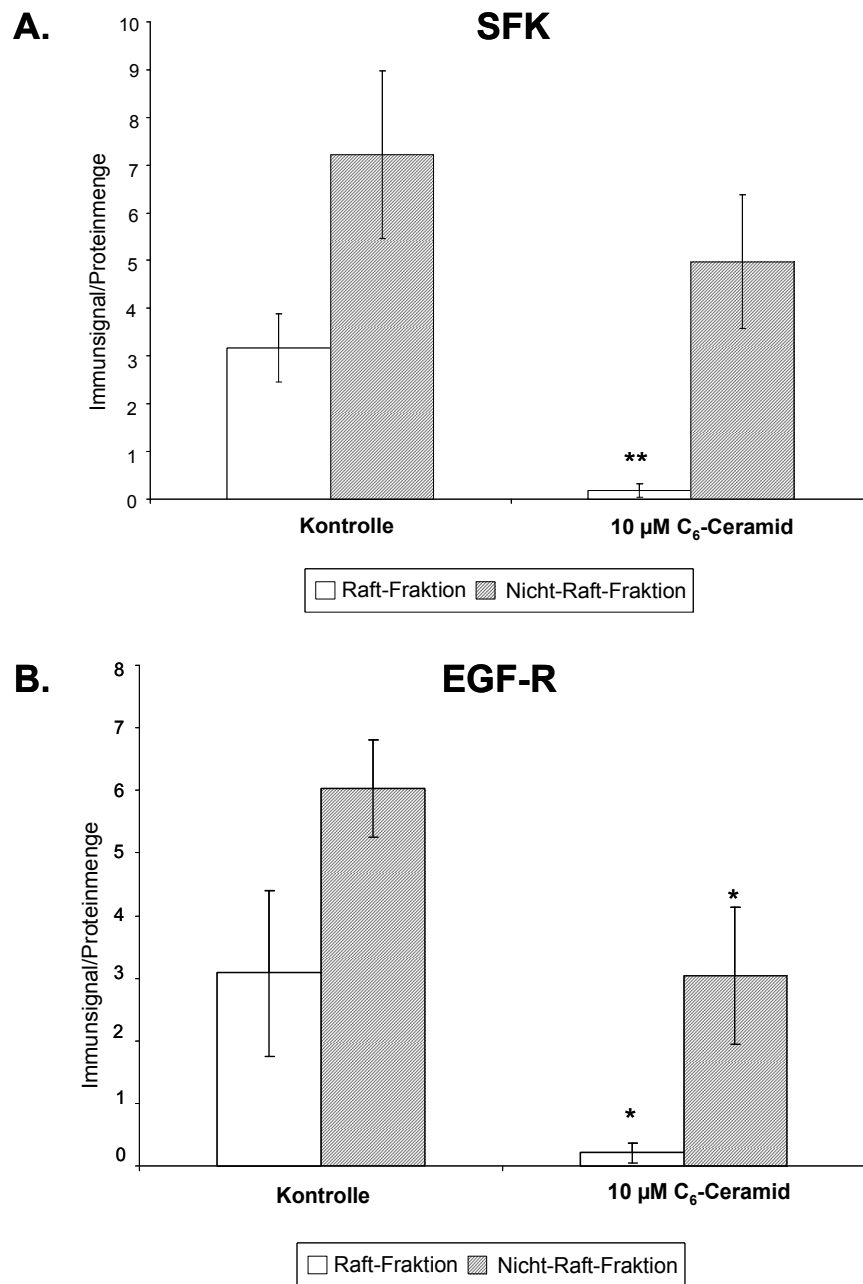
In den folgenden Versuchreihen wurden RLE-6TN Zellen für 15 min mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid behandelt und anschließend Lipid Rafts isoliert (vgl. 2.2.4). Um zu überprüfen, welche Fraktion die Raft-Fraktion ist, wurde G<sub>M</sub>1 im Dot Blot mittels Cholera-Toxin nachgewiesen (vgl. 2.2.5). Wie man in Abbildung 3.17 A erkennt, ist der

Gehalt an G<sub>M</sub>1 in Fraktion 1 und 2 am höchsten. Darum wurden diese beiden Fraktionen hier als die Raft-Fraktion bezeichnet und von der Nicht-Raft-Fraktion (3-7) abgegrenzt. Im Western Blot kann GAPDH nur in dieser Nicht-Raft-Fraktion nachgewiesen werden (Abb.3.17 B).



**Abb. 3.17: Identifikation der Raft-Fraktion in mit C<sub>6</sub>-Ceramid behandelten RLE-6TN Zellen:** RLE-6TN Zellen wurden für 15 min mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid behandelt und mit 1 % Triton X-100 lysiert. Anschließend wurden Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert. **A.** Dargestellt ist ein repräsentativer Dot Blot, der die Verteilung des Raft-Marker Gangliosid G<sub>M</sub>1 in den 7 Fraktionen zeigt. **B.** Repräsentativer Western Blot für den Nicht-Raft-Marker GAPDH nach Lyse der RLE-6TN Zellen mit 1% Triton X-100 und nachfolgender Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation über einen OptiPrep™-Gradienten.

Um auf Proteinebene zu untersuchen, ob eine Behandlung der RLE-6TN Zellen mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid die Lokalisation von SFK und des EGF-R in der Raft-Fraktion beeinflusst, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hier erkennt man, dass eine 15-minütige Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid im Vergleich zu unbehandelten RLE-6TN Zellen eine signifikante Verringerung des Gehaltes an SFK (Abb. 3.18-A) und EGF-R (Abb. 3.18-B) aus der Raft-Fraktion induziert. Wie in Abb. 3.11 gezeigt, konnten in unbehandelten Zellen 30 % des Gesamtgehaltes an SFK in der Raft-Fraktion nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid sind hier nur noch 3,6 % im Lipid Raft lokalisiert. Für den Gehalt des EGF-R ergibt sich ein ähnliches Bild. Hier konnten in unbehandelten Zellen 34 % des Gesamtgehaltes an EGF-R in Rafts gefunden werden (Abb. 3.12), der nach Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid auf 6,5 % abfällt. Es ergibt sich also nach Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid für die Raft-Lokalisation von SFK und EGF-R ein identisches Bild wie nach Behandlung mit ufCB.



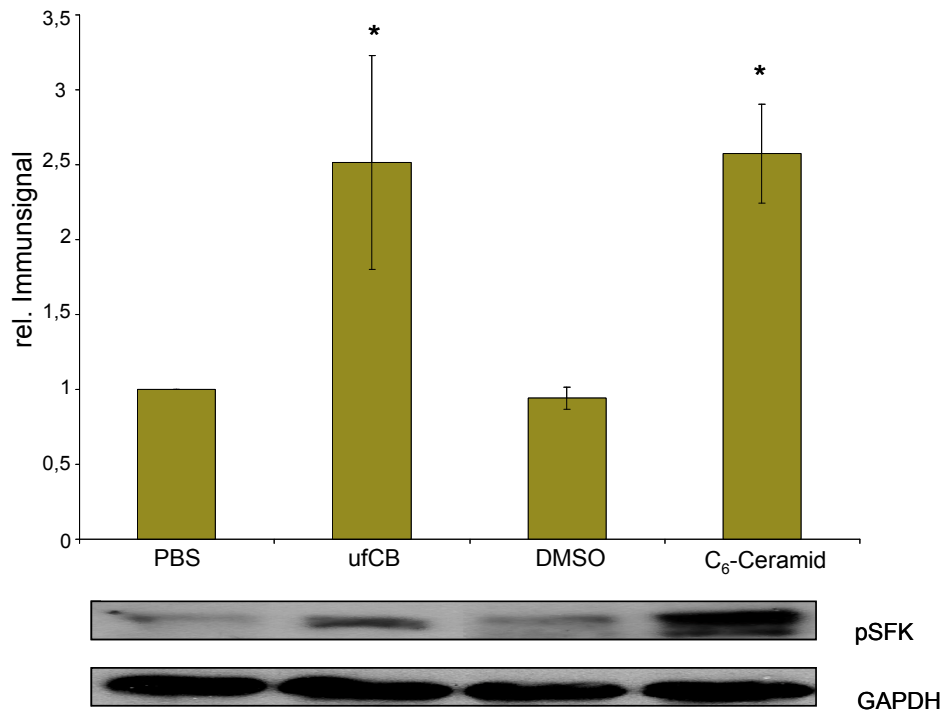
**Abb. 3.18: Einfluss von C<sub>6</sub>-Ceramid auf die Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts:** RLE-6TN Zellen wurden nicht behandelt oder für 15 min mit 10 μM C<sub>6</sub>-Ceramid behandelt. Anschließend erfolgte eine Lyse mit 1 % Triton X-100, wonach die Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Gesamtproteine **A.** SFK (tSFK) oder **B.** EGF-R in den einzelnen Fraktionen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. \*signifikant unterschiedlich zur Raft-Fraktion der unbehandelten Kontrolle (p < 0,05); \*\*signifikant unterschiedlich zur Raft-Fraktion der unbehandelten Kontrolle (p < 0,005).

### **3.9 Effekt von Lipidmediator C<sub>6</sub>-Ceramid auf die Phosphorylierung von Erk1/2 und SFK**

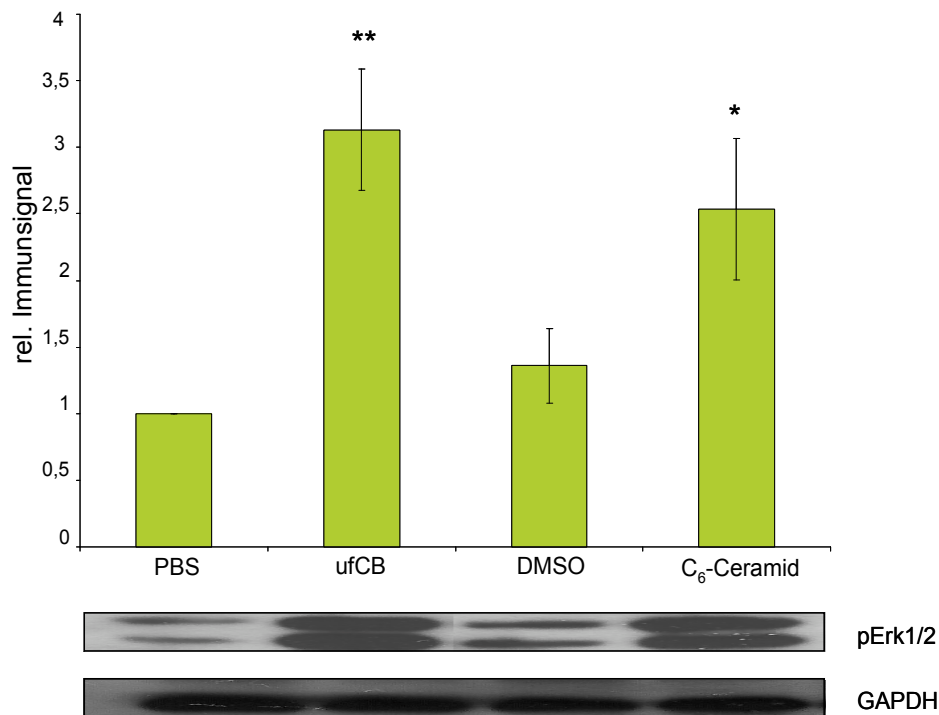
Da es nach Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid nachweislich zu einer Reduktion des Gehaltes an EGF-R und SFK in der Raft-Fraktion kommt, wurde im Folgenden untersucht, ob dieser Lipidmediator nach externer Zugabe in der Lage ist, die Aktivierung der bei der proliferativen Signaltransduktion identifizierten Proteine SFK und Erk1/2 zu induzieren.

Dazu wurden RLE-6TN Zellen für 15 min mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid oder dessen Lösungsmittelkontrolle DMSO [Endkonzentration 0,1 %] behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 8 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB belastet, um einen Vergleich zwischen beiden Behandlungen im Bezug auf die Phosphorylierung der Signalproteine zu haben. Anschließend wurde in Western-Blot-Analysen mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper der Aktivitätsstatus von SFK und Erk1/2 untersucht.

Die Behandlung mit ufCB induziert einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von SFK und Erk1/2 um den Faktor 2,5 bzw. 3,1 zur PBS Kontrolle. Die Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid induziert eine Phosphorylierung sowohl von SFK als auch Erk1/2 um den Faktor 2,6 bzw. 2,5 der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.19 und 3.20). Ceramid induziert also in ähnlichem Ausmaß wie ufCB die Phosphorylierung beider Signalproteine. Die Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO zeigte keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung der Signalproteine gegenüber der Kontrolle. Der Nachweis von GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente als Ladekontrolle und zeigte keine durch die Behandlung mit ufCB verursachte Veränderung der Proteinmenge.



**Abb. 3.19: Aktivierung von SFK durch die Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid:** RLE-6TN Zellen wurden entweder für 8 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB belastet oder für 15 min mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid bzw. DMSO [Endkonzentration 0,1%] behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-SFK (Tyr<sup>416</sup>) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (p < 0,05).



**Abb. 3.20: Aktivierung von Erk1/2 durch die Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid:** RLE-6TN Zellen wurden für 8 h mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB belastet oder für 15 min mit 10 µM C<sub>6</sub>-Ceramid bzw. DMSO [Endkonzentration 0,1%] behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-Erk1/2 in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die PBS-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis von GAPDH diene als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle ( $p < 0,05$ ); \*\* signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

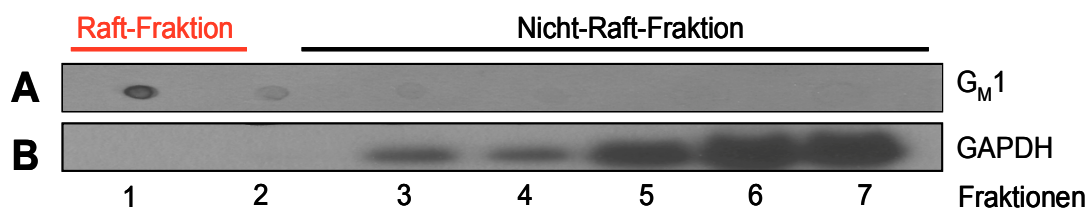
### 3.10 Wirkung von Ectoin auf die partikelinduzierte Translokation von SFK und EGF-R aus Lipid Rafts

Eine Belastung mit ufCB resultiert in einer Veränderung der Zusammensetzung der Mikrodomänen, sowohl auf Ebene der Lipide, als auch auf Ebene der Proteine. Nun sollte untersucht werden, wie sich eine Vorinkubation von Substanzen mit membran- bzw. proteinstabilisierenden Eigenschaften auf den Gehalt an Signalproteinen in den Lipid Rafts nach Partikelbelastung auswirkt. Zu solchen Substanzen gehört das kompatible Solut Ectoin (Yancey, 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine



4-stündige Vorinkubation mit Ectoin in RLE-6TN-Zellen zu einer Reduktion der partikelinduzierten Aktivierung von p38 und Erk1/2 führt (Sydlik *et al.*, 2009).

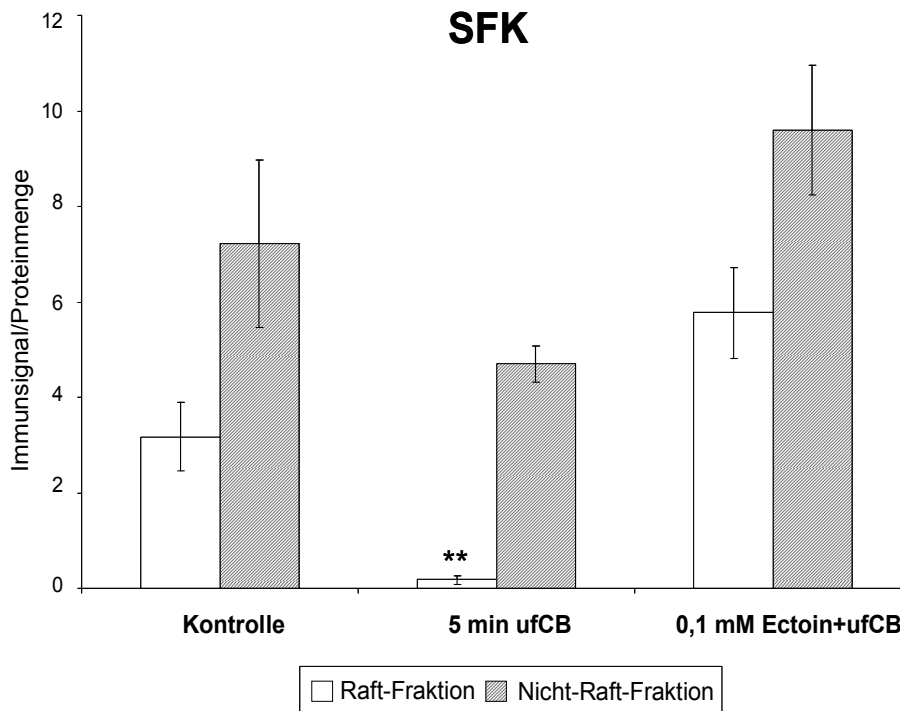
Aus diesem Grund wurde hier der Einfluss einer Vorinkubation mit Ectoin auf die partikelinduzierte Translokation von SFK und EGF-R aus der Raft-Fraktion untersucht. Dazu wurden RLE-6TN Zellen für 4 h mit 0,1 mM Ectoin vorinkubiert und für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Anschließend wurden Lipid Rafts isoliert (vgl. 2.2.4). Auch hier wurde im Dot Blot mittels Cholera-Toxin-HRP überprüft, in welchen Fraktionen  $G_M1$  als Raft-Marker angereichert ist. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist, kann  $G_M1$  in Fraktion 1 und 2 lokalisiert werden, die der Raft-Fraktion entspricht. Diese ist abgegrenzt von der Nicht-Raft-Fraktion (3-7), was im Western Blot durch den Nachweis von GAPDH gezeigt wurde.



**Abb. 3.21: Identifikation der Raft-Fraktion in mit Ectoin vorinkubierten RLE-6TN Zellen:** RLE-6TN Zellen wurden für 4 h mit 0,1 mM Ectoin behandelt und anschließend für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Nachdem die Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert wurden, erfolgte eine Isolierung der Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation. **A.** Dargestellt ist ein repräsentativer Dot Blot, der die Verteilung des Raft-Markers Gangliosid  $G_M1$  in den 7 Fraktionen zeigt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der Untereinheit B von Cholera-Toxin, gekoppelt mit Peroxidase. **B.** Repräsentativer Western Blot für den Nicht-Raft-Marker GAPDH nach Lyse der RLE-6TN Zellen mit 1 % Triton X-100 und nachfolgender Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation über einen OptiPrep™-Gradienten.

Um auf Proteinebene zu untersuchen, ob eine Vorbehandlung der RLE-6TN Zellen mit Ectoin einen Effekt auf die durch ufCB-induzierte Reduktion des Gehalts an SFK und EGF-R in Lipid Rafts hat, wurden die Fraktionen nach Ultrazentrifugation in Western-Blot-Analysen auf den Gehalt beider Proteine untersucht. Hier erkennt man nach 4-stündiger Vorinkubation mit Ectoin und anschließender 5-minütiger Belastung mit ufCB keine Reduktion des Gehalts an SFK (Abb.3. 22) und EGF-R (Abb. 3.23) in der Raft-Fraktion. Zum Vergleich sind hier noch einmal die Ergebnisse für unbehandelte

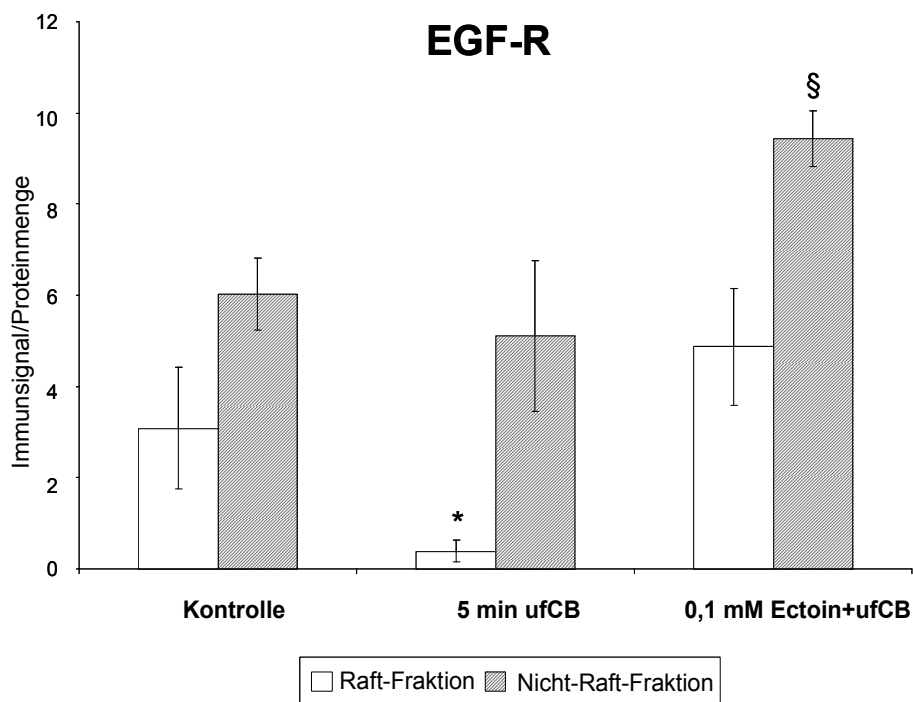
RLE-6 TN Zellen und für mit ufCB belastete Zellen dargestellt. Wie in Abb. 3.11 gezeigt, konnten in unbehandelten Zellen 30 % des Gesamtgehaltes an SFK in der Raft-Fraktion nachgewiesen werden; nach Behandlung mit ufCB nur noch 3 %. Die Vorinkubation mit Ectoin führt hier zu einem geringfügigen Anstieg von SFK in der Raft-Fraktion auf 37 %.



**Abb. 3.22: Wirkung von Ectoin auf die partikelinduzierte Translokation von SFK aus Lipid Rafts:** RLE-6TN Zellen wurden entweder nicht behandelt, für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet oder für 4 h mit 0,1 mM Ectoin vorinkubiert und anschließend für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Nachfolgend wurden die Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert; danach die Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Gesamtproteine SFK (tSFK) in den einzelnen Fraktionen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. \*\*signifikant unterschiedlich zur Raft-Fraktion der unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

Für den Gehalt an EGF-R in Lipid Rafts zeigt sich ein ähnliches Bild. In unbehandelten RLE-6TN Zellen wurden 34 % des Gesamtgehaltes an EGF-R in Lipid Rafts gefunden, der nach Behandlung mit ufCB auf 7 % abfällt (Abb. 3.12). In den vor der Partikelbelastung mit Ectoin inkubierten Zellen können 34 % des EGF-R in der Raft-Fraktion lokalisiert werden. Hier konnte auch ein signifikanter Anstieg des Gehaltes an EGF-R in der Nicht-Raft-Fraktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen detektiert

werden, der möglicherweise auf die protein- bzw. membranstabilisierenden Eigenschaften von Ectoin zurückzuführen ist, so dass ein Abbau oder die Translokation beider Proteine verhindert wird.

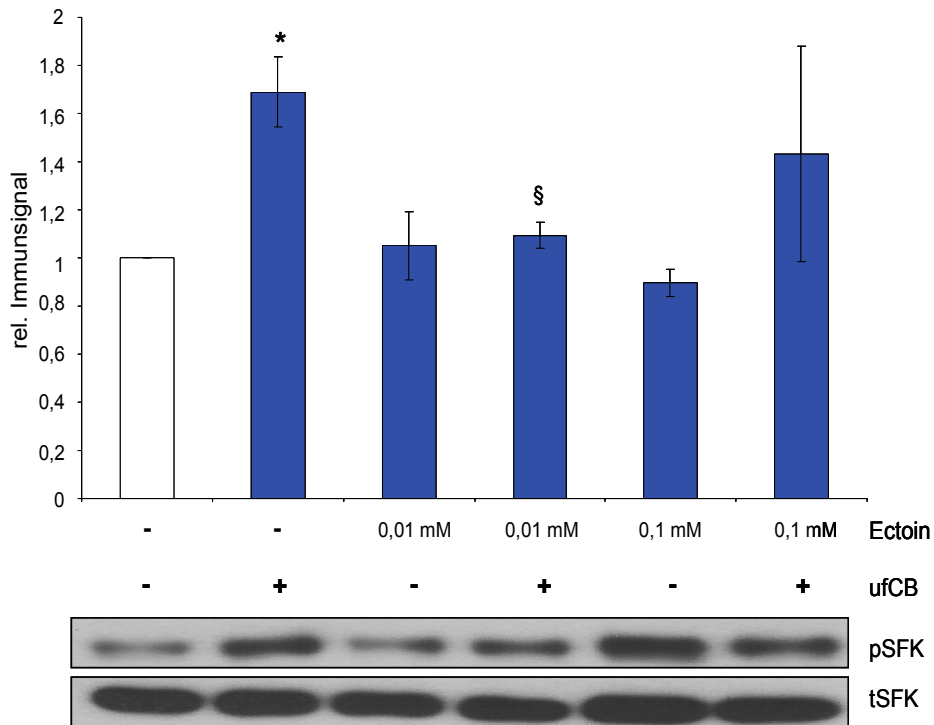


**Abb. 3.23: Wirkung von Ectoin auf die partikelinduzierte Translokation von EGF-R aus Lipid Rafts:** RLE-6TN Zellen wurden entweder nicht behandelt, für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet oder für 4 h mit 0,1 mM mit Ectoin vorinkubiert und anschließend für 5 min mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Nachfolgend wurden die Zellen mit 1 % Triton X-100 lysiert; danach die Lipid Rafts über einen OptiPrep™-Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Nachweis der Gesamtproteine EGF-R (tEGF-R) in den einzelnen Fraktionen. \*signifikant unterschiedlich zur Raft-Fraktion der unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,05$ ); § signifikant unterschiedlich zur Nicht-Raft-Fraktion der unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ).

### **3.11 Einfluss von Ectoin auf die partikelinduzierte Aktivierung von SFK**

Eine Vorinkubation mit Ectoin resultiert in RLE-6TN Zellen in einer signifikanten Reduktion der partikelinduzierten Aktivierung von Erk1/2 (Sydlik *et al.*, 2009). Darum wurde im Folgenden untersucht, ob eine Vorinkubation mit Ectoin auch einen Effekt auf die partikelinduzierte Phosphorylierung von SFK hat. Dafür wurden RLE-6TN Zellen für 4 h mit 0,1 bzw. 0,01 mM Ectoin vorinkubiert und anschließend für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet.

Die Behandlung mit ufCB induziert einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von SFK um den Faktor 1,7 zur PBS Kontrolle (Abb. 3.24). Die Vorinkubation mit 0,01 mM Ectoin reduziert die partikelinduzierte Aktivierung von SFK signifikant auf Kontrollniveau. Die Vorinkubation mit 0,1 mM Ectoin zeigt eine Verringerung der Phosphorylierung von SFK, die aber aufgrund der großen Standardabweichung nicht signifikant ist. Eine Behandlung nur mit Ectoin hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von SFK im Vergleich zur Kontrolle. Der Nachweis der Gesamtproteine SFK (tSFK) zeigte keine durch die Behandlung mit ufCB verursachte Veränderung der Proteinmenge und wurde als Ladekontrolle betrachtet.



**Abb. 3.24: Wirkung von Ectoin auf die partikelinduzierte Aktivierung von SFK:** RLE-6TN Zellen wurden für 4 h mit 0,01 bzw. 0,1 mM Ectoin vorinkubiert und anschließend für 8 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB belastet. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach der densitometrischen Auswertung der Immunsignalintensität von phospho-SFK (Tyr<sup>416</sup>) in Western-Blot-Analysen in Bezug auf die H<sub>2</sub>O-Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Gesamtproteine SFK (tSFK) diene als Ladekontrolle. \* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ( $p < 0,01$ ); § signifikant unterschiedlich zur Belastung mit ufCB ( $p < 0,01$ ).

## 4. Diskussion

Die ultrafeine Partikelfraktion des Schwebstaubs in der Luft kann aufgrund ihrer geringen Größe bis in alveolare Regionen der Lunge vordringen (Oberdörster *et al.*, 2005). Dort werden ultrafeine Partikel weniger effizient von alveolaren Makrophagen beseitigt als feine Partikel und können darum verstärkt mit Lungenepithelzellen interagieren (Kreyling & Scheuch, 2000; Donaldson *et al.*, 2005). Diese Eigenschaft und ihre Fähigkeit, ROS zu generieren, tragen entscheidend zur Toxizität dieser Partikel bei (Donaldson *et al.*, 2001). Eine Exposition gegenüber diesen ultrafeinen Partikeln induziert pathogene Endpunkte wie Proliferation, Apoptose oder Entzündung (Sydlik *et al.*, 2006; Monteiller *et al.*, 2007). Die molekularen Mechanismen der Partikeltoxizität sind bis *dato* nur unvollständig verstanden. Die derzeitige Hypothese geht von einer Beteiligung von Membranrezeptoren und einer Induktion verschiedener Signaltransduktionswege aus (Albrecht *et al.*, 2004; Unfried *et al.*, 2007). Auf Membranebene sind Rezeptoren wie  $\beta$ 1-Integrine und der EGF-R, aber auch die Membran-ständige PI3-K oder Lipidmediatoren in die partikelinduzierte Signaltransduktion involviert (Beck-Speier *et al.*, 2005; Unfried *et al.*, 2007; Unfried *et al.*, 2008). Signalprozesse können in Membranmikrodomänen initiiert werden, in denen Signalproteine angereichert sind und deren Zusammensetzung sich durch Umweltstimuli verändern kann (Simons & Toomre, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Rolle dieser Domänen bei der durch verbrennungsgenerierte Modellpartikel (ufCB, Printex<sup>®</sup> 90) induzierten proliferativen Signaltransduktion in der Lungenepithel-Zelllinie RLE-6TN untersucht. Zudem sollte die Funktion von Membran-assoziierten SFK innerhalb dieses Signaltransduktionsweges aufgeklärt werden.

### 4.1 Aktivierung von SFK durch ultrafeine CB-Partikel

In RLE-6TN Zellen wird nach Belastung mit ufCB der Endpunkt Proliferation induziert, wobei hier eine Akt-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 beobachtet wurde (Sydlik *et al.*, 2006) Auf Membranebene ist dabei nicht nur der PI3-K/Akt Signalweg involviert, sondern auch die Oberflächenrezeptoren EGF-R und  $\beta$ 1-Integrine (Unfried *et al.*, 2008). Das belegt die Bedeutsamkeit von

Membranbestandteilen bei der durch ufCB-induzierten proliferativen Signaltransduktion. Die Verbindung zwischen Membranrezeptoren und *downstream* aktivierten Signalmolekülen könnten Membran-assoziierte SFK herstellen. Diese sind in proliferative Signalprozesse involviert und können zudem die Aktivität von Membranrezeptoren beeinflussen (Brown & Cooper, 1996; Moro *et al.*, 2002; Ishizawa & Parsons, 2004).

Es konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass eine Belastung von RLE-6TN Zellen mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB eine zeitabhängige Phosphorylierung von SFK induziert. Es zeigte sich eine biphasische Aktivierung dieser Kinasen (Abb. 3.1). Die Phosphorylierung an Tyr<sup>416</sup>, die hier in Western-Blot-Analysen untersucht wurde, ist notwendig für die maximale Kinaseaktivität von SFK. Im inaktiven Zustand sind SFK nicht an Tyr<sup>416</sup> phosphoryliert, dafür an Tyr<sup>527</sup> im C-Terminus des Proteins (Giannoni *et al.*, 2010).

Die Aktivierung von SFK zu einem frühen und abermals zu einem späten Zeitpunkt könnte mit der partikelinduzierten Bildung von ROS in Verbindung stehen. Nach Belastung von RLE-6TN Zellen mit ufCB wurde die Produktion von sowohl intrazellulären, als auch extrazellulären ROS detektiert (Weissenberg *et al.*, 2010). Theoretisch kann die erste Aktivierung nach 5 min durch den plötzlichen Anstieg extrazellulär gebildeter ROS induziert werden. Diese können möglicherweise schnell durch antioxidativ-wirkende Enzyme beseitigt werden, wodurch die Phosphorylierung von SFK wieder auf das Kontrollniveau sinkt. Wenn die Partikel nach Aufnahme in die Zelle intrazellulär ROS bilden und deren Menge die antioxidative Kapazität der Zelle übersteigt, könnte dass die erneute Aktivierung von SFK zu dem späten Zeitpunkt erklären (Li *et al.*, 2008). Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass der Gehalt von GSH nach Belastung mit ufCB sinkt, was auf die Zunahme von oxidativem Stress in den RLE-6TN Zellen hindeutet (Weissenberg *et al.*, 2010). Es wurde zudem beobachtet, dass SFK Membran-ständige NADPH-Oxidasen aktivieren und damit die Produktion von ROS induzieren können, was zum Anstieg intrazellulär gebildeter ROS beitragen könnte (Gianni *et al.*, 2008).

Die beobachtete biphasische Aktivierung von SFK nach Partikelbelastung konnte ebenfalls für die Aktivität des EGF-R und der MAP-Kinasen Erk1/2 gezeigt werden (Sydlik *et al.*, 2006; Unfried *et al.*, 2008). Eine andere Erklärung für das biphasische Muster der Phosphorylierung der Signalproteine nach Partikelbelastung könnte sein, dass eine ROS-abhängige Aktivierung des EGF-R zu einem frühen Zeitpunkt die

Expression von EGF-R-Liganden wie HB-EGF oder Amphiregulin induziert. In Form einer autokrinen Schleife könnten diese Liganden so nach mehreren Stunden zu einer erneuten Aktivierung des EGF-R führen und damit auch die Aktivität der SFK beeinflussen. Diese Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, dass eine Belastung mit DEP in HBE-Zellen die Expression des EGF-R-Liganden Amphiregulin induziert (Blanchet *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe von Tamaoki *et al.* (2004) beobachtete zudem, dass eine Belastung mit ufCB in HBE-Zellen die Freisetzung von HB-EGF ins Kulturmedium induziert. Dies führt zu einer Transaktivierung des EGF-R bei der partikelinduzierten Proliferation. Dabei sind ROS an der partikelinduzierten Expression von HB-EGF beteiligt. Inwieweit eine autokrine Schleife für die beobachtete biphasische Aktivierung der Signalproteine nach Partikelbelastung in RLE-6TN Zellen verantwortlich ist, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Nach Zelladhäsion kann in Fibroblasten eine biphasische Aktivierung von SFK detektiert werden. Hier resultiert der erste Peak der Aktivierung von SFK aus der Dephosphorylierung von Tyr<sup>527</sup> im C-Terminus, induziert durch Membran-assoziierte Phosphatasen. Der spätere Peak wird dadurch bedingt, dass es durch die Produktion von ROS nach Integrin-Aktivierung zu einer Oxidation von Cystein-Resten in SFK kommt. Dies resultiert in einer verstärkten Kinaseaktivität von SFK (Giannoni *et al.*, 2005). Ob solche Oxidationsprozesse auch eine Rolle spielen bei der durch ufCB-induzierten Aktivierung von SFK in RLE-6TN Zellen, kann nur vermutet werden. ROS könnten hier aber bereits zu einem frühen Zeitpunkt an der durch Oxidation induzierten Aktivierung von SFK beteiligt sein, da schon 5 min nach Partikelbelastung deren Bildung detektiert werden kann (Weissenberg *et al.*, 2010). In weiterführenden Versuchen mit Hilfe antioxidativ-wirkender Enzyme muss geklärt werden, ob ROS eine Rolle bei der partikelinduzierten Aktivierung von SFK spielen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass SFK auch nach Belastung mit Asbest oder kristallinem Silica (Quarz) phosphoryliert werden (Øvrevik *et al.*, 2004; Scapoli *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006). Asbest und Silica sind wie ufCB in der Lage, die Bildung von ROS zu induzieren (Fubbini & Hubbard, 2003; Luster & Simeonova, 1998). Asbest z.B. kann, katalysiert durch Eisenverunreinigungen an der Oberfläche, in Fenton-ähnlichen Reaktionen ROS generieren (Ghio *et al.*, 1992; Luster & Simeonova, 1998). Somit könnte die beobachtete Aktivierung von SFK eine gemeinsame Reaktion auf eine Belastung mit Partikeln unterschiedlichster



chemischer Zusammensetzung sein, die aber alle in der Lage sind, ROS zu bilden. Im Gegensatz dazu induzieren feine CB-Partikel, die keine ROS produzieren (Wilson *et al.*, 2002), in der vorliegenden Arbeit auch keine Phosphorylierung von SFK (Abb. 3.2). Somit ist die Aktivierung von SFK also keine Reaktion auf jeden physikalischen Reiz. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass diese feinen Partikel, die einen Durchmesser von 260 nm aufweisen, auch nicht in der Lage sind, in RLE-6TN Zellen Proliferation zu induzieren (Sydlik *et al.*, 2006). In der Literatur ist beschrieben, dass ultrafeine Partikel stärker entzündlich wirken als feine Partikel der gleichen chemischen Zusammensetzung (Anderson *et al.*, 1990; Ferin *et al.*, 1994; Monteiller *et al.*, 2007). Die Arbeitsgruppe von Monteiller *et al.* (2007) konnte z.B. nachweisen, dass spezifisch ultrafeines CB die Produktion des entzündungsfördernden Zytokins IL-8 in Lungenepithelzellen induziert.

Ultrafeine Partikel haben bei gleicher Masse eine größere Oberfläche als feine Partikel der gleichen chemischen Zusammensetzung (Oberdörster *et al.*, 2001). Das ufCB, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, hat eine Oberfläche von 254 m<sup>2</sup>/g, die damit ca. 32-mal größer ist als die Oberfläche feiner CB-Partikel mit 7,82 m<sup>2</sup>/g (Monteiller *et al.*, 2007). Bei ultrafeinen Partikeln einer Größe von 10 nm befinden sich ca. 10 % der Atome auf der Oberfläche. Im Gegensatz dazu sind bei einem Partikel im µm-Bereich weniger als 1 % der Atome an der Oberfläche identifiziert worden (Jones & Grainger, 2009). Dieser Umstand resultiert in einer Änderung chemischer und physikalischer Eigenschaften, je kleiner die Partikel werden, wodurch die hier detektierten Unterschiede in der Reaktivität zwischen feinem und ultrafeinem CB erklärt werden könnten (Roduner, 2006).

## 4.2 Beteiligung von SFK an der partikelinduzierten Proliferation

Bei der partikelinduzierten Proliferation in RLE-6TN Zellen wurde eine Akt-abhängige Aktivierung von Erk1/2 detektiert (Unfried *et al.*, 2008). Da gezeigt werden konnte, dass die Belastung von RLE-6TN Zellen mit ufCB die SFK aktivieren, wurde der Einfluss von SFK auf die Signalproteine Erk1/2 und Akt untersucht. Dazu wurden RLE-6TN Zellen vor Partikelbelastung mit dem spezifischen SFK-Inhibitor PP2 inkubiert und die Phosphorylierung der Signalproteine Erk1/2 und Akt analysiert. Nach Inhibierung der SFK ist die durch ufCB-induzierte Phosphorylierung von sowohl

Erk1/2 als auch Akt reduziert (Abb. 3.3 und 3.4). In einem unabhängigen Ansatz zeigte der *knockdown* von c-Src mittels siRNA ebenfalls eine Verringerung der Phosphorylierung von Akt (Abb. 3.5). Somit können SFK, hier spezifisch c-Src, bei der partikelinduzierten Proliferation *upstream* von beiden Signalproteinen lokalisiert werden.

Auch für faserige Partikel konnte die SFK-abhängige Aktivierung von Erk1/2 bei der Proliferation beschrieben werden. In murinen Lungenepithelzellen (C10) wurde nach Belastung mit Asbest die SFK-abhängige Aktivierung von Erk1/2 detektiert. Die Aktivität beider Signalproteine spielt bei der durch Asbest induzierten Proliferation in diesen Zellen eine entscheidende Rolle (Scapoli *et al.*, 2004). In Lungenepithelzellen (A549) sind SFK an der Regulation der Aktivität von Erk1/2 während der durch Silica-Partikel induzierten Freisetzung von IL-8 beteiligt. Hier wurde nach Inhibierung der SFK eine Reduktion der Aktivität von Erk1/2 auf Kontrollniveau detektiert. Zudem zeigt sich, dass spezifisch c-Src, und nur zu einem geringeren Maß Lyn, nach Silica-Exposition phosphoryliert werden (Øvrevik *et al.*, 2004). Diese Daten aus der Literatur zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen deuten darauf hin, dass zumindest die SFK-abhängige Aktivierung von Erk1/2 eine gemeinsame Reaktion auf eine Belastung mit ROS-induzierenden Partikeln ist. Da SFK in mehrere Signalprozesse involviert sind, könnten sie auch unterschiedliche Endpunkte beeinflussen, wie in den gezeigten Studien die Proliferation oder die IL-8 Freisetzung.

Auch in intestinalen Epithelzellen sind SFK *upstream* von Erk1/2 und Akt beim Schutz der Zellen vor Anoikis, einer besonderen Form der Apoptose nach Verlust der EZM-Kontakte, detektiert wurden (Loza-Coll *et al.*, 2005). In humanen Endothelzellen kann nach Adhäsion die Aktivierung von SFK, unter anderem c-Src, beobachtet werden. Diese ist notwendig für die Phosphorylierung des EGF-R und die folgende Aktivierung von Erk1/2 und Akt beim Schutz der Zellen vor Apoptose. Hier wurde nach Bindung der Integrine an EZM-Proteine eine Aktivierung von SFK durch Oxidation beobachtet, welche eine ligandenunabhängige Aktivierung des EGF-R induziert (Giannoni *et al.*, 2008). Auch Arbeiten von Moro *et al.* (2002) zeigen, dass SFK bei der Interaktion zwischen Integrinen und dem EGF-R eine Rolle spielen. Nach Zelladhäsion vermitteln SFK im Komplex mit Integrinen und dem EGF-R die ligandenunabhängige Aktivierung des EGF-R (Moro *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 2002). Da  $\beta$ 1-Integrine und der EGF-R auch bei der partikelinduzierten Proliferation in RLE-

6TN Zellen involviert sind, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob SFK hier bei der Interaktion beider Rezeptoren eine Rolle spielen (Sydlik *et al.*, 2006). Nach Inhibierung der Rezeptoren wurde darum der Aktivitätsstatus von SFK analysiert. Interessanterweise kann hier sowohl nach Inhibierung der  $\beta$ 1-Integrine als auch nach Inhibierung des EGF-R eine Verringerung der Phosphorylierung von SFK detektiert werden (Abb. 3.6 und 3.7). Die SFK sind somit *downstream* der beteiligten Rezeptoren lokalisiert. Nach den hier erzielten Ergebnissen ist es eher unwahrscheinlich, dass sie die Interaktion zwischen EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen bei der durch uCB-induzierten Proliferation vermitteln. Das kann zumindest für den späten Zeitpunkt der Phosphorylierung von SFK geschlossen werden, der in dieser Arbeit untersucht wurde. Ob SFK, die ja bereits nach 5 min aktiviert werden, an der Interaktionsvermittlung zwischen den Rezeptoren zu diesem frühen Zeitpunkt beteiligt sind, muss in weiteren Studien überprüft werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SFK, spezifisch c-Src, bei der durch uCB-induzierten Proliferation *upstream* von Erk1/2 und Akt eine essentielle Funktion haben. Zudem hängt die Phosphorylierung von SFK maßgeblich von der Aktivität des EGF-R und der  $\beta$ 1-Integrine ab.

### 4.3 Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts

Auf Membranebene bilden Mikrodomänen, die eine spezifische Protein- und Lipidzusammensetzung besitzen, geeignete Plattformen zur Initiation von Signalprozessen (Simons & Toomre, 2000). Hier sind Signalproteine lokalisiert, die auch bei der proliferativen Signaltransduktion eine Rolle spielen (Zajchowski & Robbins, 2002). Eine Raft-Lokalisation von EGF-R und SFK in RLE-6TN Zellen könnte auf eine mögliche Beteiligung dieser Signalplattformen an der partikelinduzierten Proliferation hindeuten.

Der EGF-R konnte in unterschiedlichen Zelltypen in Lipid Rafts lokalisiert werden. Mineo *et al.* (1999) beschrieben, dass nach biochemischer Isolierung von Rafts aus unstimulierten Rat-1-Zellen (Fibroblasten) ca. 49 % des EGF-R in Caveolae, spezifischen Caveolin-1 enthaltenden Lipid Rafts, lokalisiert ist. In HeLa-Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz die Kolokalisation von EGF-R mit dem Raft-Marker  $G_M1$  detektiert. (Roepdorff *et al.*, 2002). Die Arbeitsgruppe von Hofman *et al.* (2008)

konnte in unstimulierten Fibroblasten ebenfalls mikroskopisch eine Kolo­kalisierung von EGF-R mit G<sub>M</sub>1 beobachten. Ringerike *et al.* (2002) zeigte mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen, dass in unbehandelten HEp-2 Zellen (humane Larynx-Epithelioma Zelllinie) ca. 40 % des EGF-R-Gehalts der Plasmamembran in Lipid Rafts lokalisiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach biochemischer Isolierung in unbehandelten RLE-6TN Zellen 30 % der Gesamtproteine von SFK und 34 % der Gesamtproteine von EGF-R in Lipid Rafts lokalisiert (Abb. 3.11 und 3.12). Diese Befunde aus der Literatur zusammen mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen für den Gehalt des EGF-R in Lipid Rafts könnten ein Hinweis darauf sein, dass generell zwischen 40 und 50 % des EGF-R in Lipid Rafts lokalisiert ist, unabhängig vom Zelltyp.

Wie oben beschreiben, konnte der EGF-R auch in Caveolae identifiziert werden (Mineo *et al.*, 1999; Waugh *et al.*, 1999). Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten biochemischen Isolierungsmethode kann nicht zwischen Lipid Rafts und Caveolae unterschieden werden. Beide besitzen eine ähnliche Lipidzusammensetzung und sich deshalb nach Ultrazentrifugation im Gradienten in den gleichen Bereichen zu finden (Simons & Toomre, 2000). Aus der Literatur ist bekannt, dass alveolare Typ II Lungene­pithelzellen, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchten RLE-6TN Zellen gehören, zwar kein Caveolin-1 enthalten, in Zellkultur mit der Zeit aber exprimieren können (Campbell *et al.*, 1999). Aus diesen Gründen kann hier keine Aussage darüber gemacht werden, ob der EGF-R und auch die SFK in RLE-6TN Zellen in Lipid Rafts, in Caveolae oder in beiden Strukturen lokalisiert sind. Hier müssen mikroskopische Studien folgen. Letztendlich muss einschränkend gesagt werden, dass mittels biochemischer Methoden zur Isolierung von Rafts nur bedingt auf die tatsächliche Lokalisation der Proteine *in vivo* geschlossen werden kann. Es konnte aber gezeigt werden, dass Proteine, die in DRM lokalisiert sind, auch *in vivo* eine hohe Affinität für diese Domänen besitzen (Shogomori & Brown, 2003).

In der Literatur ist beschrieben, dass der EGF-R nach Zelllyse mit 1 % Triton X-100 und anschließender Ultrazentrifugation nicht in Lipid-Rafts lokalisiert werden kann (Roepstorff *et al.*, 2002; Pike *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit der EGF-R aber in Triton X-100-unlöslichen Lipid Rafts detektiert. Dieser Befund könnte somit spezifisch für RLE-6TN Zellen sein.

Für die Lokalisation von SFK gibt es ebenfalls mehrere Befunde die zeigen, dass diese Kinasen in Lipid Rafts angereichert sind. In unstimulierten PC12 Zellen z.B. wurden SFK, vor allem Yes und Fyn, nach 1-stündiger Lyse mit 0,25 % Triton X-100 und nachfolgender Ultrazentrifugation in Lipid Rafts detektiert (Kasai *et al.*, 2005). In Keratinozyten konnte Yes nach Lyse mit 0,5 % Triton X-100 und anschließender Ultrazentrifugation über OptiPrep™-Gradienten in Lipid Rafts gefunden werden (Gagnoux-Palacios *et al.*, 2003). Es ist beschrieben, dass SFK wie Fyn, die neben der *N*-Myristoylierung auch palmitoyliert sind, in Caveolae detektiert werden können (Shenoy-Scaria *et al.*, 1994). In unbehandelten neuronalen Zellen kann c-Src nach Detergenz-freier Isolierungsmethode über Sucrosegradienten in Lipid Rafts lokalisiert werden. Hier wurde mikroskopisch eine Koloalokalisation von c-Src mit dem Raft-Marker Flotillin-1 beobachtet (Zhao *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnten SFK in unbehandelten RLE-6TN Zellen nach Lyse mit 1 % Triton X-100 ebenfalls in Lipid Rafts lokalisiert werden.

Zusammenfassend kann aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse und der Befunde aus der Literatur gesagt werden, dass der EGF-R und Src-Familie-Kinasen in verschiedenen Zelltypen in Lipid Rafts angereichert sind.

#### **4.4 Partikel beeinflussen die Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts**

Die Lokalisation verschiedener Signalproteine in Lipid Rafts unterliegt dynamischen Prozessen. Dabei zeigen Befunde aus verschiedenen Systemen, dass nach einer Aktivierung des EGF-R durch z.B. EGF dieser aus der Raft-Region verlagert und hier nicht mehr nachgewiesen werden kann (Roepstorff *et al.*, 2002; Mineo *et al.*, 1999). Mineo *et al.* (1999) beobachteten, dass in Rat-1-Zellen nach Stimulation mit EGF, nur noch 14 % des EGF-R in Lipid Rafts lokalisiert sind. In unstimulierten Zellen waren hier ca. 49 % gefunden worden. Das ist eine Abnahme um 72 %. Nach Roepstorff *et al.* (2002) hat die Raft-Region einen inhibierenden Einfluss auf die Aktivierung des Rezeptors. Die Rezeptoren sind hier weniger gut zugänglich für Liganden als in der Nicht-Raft-Region der Plasmamembran. Die Arbeitsgruppe von Ringerike *et al.* (2002) beobachtete nach Depletion von Cholesterol eine Hyperphosphorylierung und schnellere Dimerisierung des EGF-R. Sie erklären das damit, dass nach

Verringerung des Cholesterolgehaltes die laterale Beweglichkeit des Rezeptors in der Membran erleichtert wird und dieser somit schneller dimerisieren kann.

Daneben gibt es auch Studien, die zeigen, dass der EGF-R, nach Stimulierung von PC12 Zellen mit EGF, in der Raft-Fraktion verbleibt. Der Gehalt von EGF-R in diesen Domänen nimmt nach Aktivierung sogar noch zu (Kasai *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe von Puri *et al.* (2005) beschreibt, dass in HeLa-Zellen erst nach Aktivierung mit EGF der EGF-R in Triton X-100-unlöslichen Rafts detektiert werden kann.

Für die Lokalisation von SFK gibt es Befunde die zeigen, dass diese nach Stimulierung der Zellen ebenfalls in Lipid Rafts verbleiben. In Mastzellen aktivieren Raft-assoziierte SFK nach Behandlung mit IgE den IgE-Rezeptor in Mikrodomänen (Sheets *et al.*, 1999). In PC12 Zellen verbleiben SFK nach Inkubation der Zellen mit EGF ebenfalls in Mikrodomänen (Kasai *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Gehalt von SFK und EGF-R in Lipid Rafts nach Belastung der RLE-6TN Zellen für 5 min mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ufCB in der Raft-Region drastisch abnimmt. Nach Behandlung sind nur noch 3 % SFK bzw. 7 % EGF-R in diesen Fraktionen vorhanden (Abb. 3.11 und 3.12). Durch ufCB erfolgt aber keine Zerstörung der Rafts, da nach Partikelbelastung immer noch  $G_M1$ -reiche Domänen in Fraktion 1 und 2 vorhanden sind, ähnlich wie in unbehandelten Zellen (Abb. 3.10). Zudem ist die Proteinverteilung in den einzelnen Fraktionen nach Partikelbelastung unverändert (Abb. 3.9).

Die Unterschiede im Verhalten von Signalproteinen - entweder ein Verbleiben in Rafts, eine Rekrutierung in diese Domänen oder eine Translokation aus Rafts - könnten zelltypspezifisch sein. Zudem spielt auch die Methode der Isolierung von Rafts eine Rolle. Auch werden in den beschriebenen Studien jeweils verschiedene Signalwege untersucht. Es kann hier angenommen werden, dass Signalproteine bei einem Signalprozess spezifisch in Rafts rekrutiert werden, bei einem anderen aus Rafts verlagert, um aktiviert zu werden. Zudem kann hier auch der Proteinbestand der einzelnen Rafts einen Einfluss darauf haben, ob Signalproteine in Raft-Regionen verbleiben oder aus diesen verlagert werden. Es könnten in der Raft-Region z.B. Phosphatasen aktiv sein, die einen inhibierenden Einfluss auf Rezeptoren oder Kinasen haben. Erst nach Translokation der Signalproteine aus der Raft-Region wird diese Inhibierung aufgehoben (Simons & Toomre, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Translokation von SFK und EGF-R nach Belastung der RLE-6TN

Zellen macht deutlich, dass die Proteinzusammensetzung der Lipid Rafts variabel ist und unterstreicht deren Dynamik.

Es stellt sich nun die Frage, „wohin“ die SFK und der EGF-R nach Partikelbelastung verlagert werden, da auch keine Zunahme des Gehaltes beider Proteine in der Nicht-Raft-Region im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde. Hier kann vermutet werden, dass die Proteine vielleicht nach Aktivierung abgebaut werden. Für den EGF-R ist bekannt, dass dieser nach seiner Aktivierung über *clathrin-coated pits* internalisiert werden kann und zu Endosomen transportiert wird. Von dort aus erfolgen ein Transport zu Lysosomen und ein Abbau der Rezeptoren (Madhus & Stang, 2009). Für c-Src wurde ebenfalls ein ubiquitin-abhängiger Abbau nach Aktivierung beschrieben (Harris *et al.*, 1999). Diese Hypothese könnte mit Hilfe von Inhibitoren für die einzelnen Abbauwege der untersuchten Signalproteine überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem nachgewiesen werden, dass nur ufCB-Partikel eine Translokation von SFK und EGF-R aus der Raft-Fraktion induzieren. Nach Belastung mit feinen CB-Partikeln kann keine Veränderung des Gehaltes an SFK und EGF-R in diesen Domänen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 3.14 und 3.15). Das passt zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, dass fCB-Partikel ebenfalls keine Aktivierung der SFK induzieren. Auch haben sie keinen Einfluss auf die durch ufCB-induzierte Proliferation in RLE-6TN Zellen (Sydlik *et al.*, 2006). Das zeigt, dass die Translokation von SFK und EGF-R spezifisch ist für ultrafeine Partikel und damit nanotoxikologische Relevanz besitzt.

#### **4.5 Einfluss von Lipidmediator Ceramid auf die Lokalisation von SFK und EGF-R in Lipid Rafts**

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass ufCB eine Translokation von SFK und EGF-R aus Lipid Rafts induziert; d.h. die Proteinzusammensetzung der Lipid Rafts verändert, ohne aber diese Strukturen zu zerstören. Es stellt sich nun die Frage, wie diese Veränderungen initiiert werden. Hier könnten Modifikationen auf Lipidebene der Rafts, z.B. durch die Produktion von Lipidmediatoren wie Ceramiden eine Rolle spielen.

Verschiedene Umweltstimuli können auf Zellmembranebene die Produktion von Ceramiden induzieren (Ohanian & Ohanian, 2001). Ceramide können enzymatisch durch Hydrolyse von Sphingomyelin, durch *de novo* Synthese oder den Abbau von Glykosphingolipiden gebildet werden. Sie sind kleine Lipidmediatoren, die nach Generierung in der Membran verbleiben und weiter prozessiert werden können zu Sphingosin-1-Phosphat und Ceramid-1-Phosphat, die selbst Signalmoleküle darstellen (Hannun & Luberto 2000; Hannun *et al.*, 2001, Fyrst & Saba, 2010). Ceramide spielen als *second messenger* eine Rolle bei der Genexpression, der Proliferation und der Apoptose (Hannun *et al.*, 2001; Monick *et al.*, 2001; Hueber, 2002). UVA-Strahlung als Umweltstimulus induziert in humanen Keratinozyten einen durch Singulett-Sauerstoff vermittelten Anstieg von Ceramiden. Diese werden nicht-enzymatisch bereits nach 30 min aus Sphingomyelin gebildet und führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sowie zur Induktion der Genexpression von u.a. Serin-Palmitoyltransferasen (SPT). SPT sind an der *de novo* Synthese von Ceramiden beteiligt und induzieren die nach UVA-Bestrahlung detektierte erneute Bildung dieses Lipidmediators nach 16 h. Durch die externe Zugabe von C<sub>6</sub>-Ceramid kann die durch UVA-induzierte Produktion von SPT nachgeahmt werden (Grether-Beck *et al.*, 2000; Grether-Beck *et al.*, 2005). Zudem löst UVA-Strahlung Veränderungen der Lipidzusammensetzung von Rafts in Keratinozyten aus. Es konnte hier eine Verringerung des Gehaltes an Cholesterol und Sphingomyelin detektiert werden. Dabei ist für die Initiation der Signaltransduktion nach UVA-Bestrahlung das Verhältnis von Cholesterol zu Ceramid in den Mikrodomänen entscheidend: Signalprozesse werden hier initiiert, wenn die Konzentration von Ceramiden groß genug ist, um Cholesterol aus der Membran zu verdrängen (Grether-Beck *et al.*, 2008). Dass Ceramide in der Lage sind, selektiv Cholesterol aus Lipid Rafts zu verdrängen, wurde bereits in einer anderen Studie nachgewiesen. In Lipidvesikeln, die Raft-Domänen ausbilden, kann nach externer Zugabe von Ceramiden eine Verdrängung von Cholesterol aus diesen Domänen beobachtet werden (Megha & London, 2004). Es ist zudem gezeigt worden, dass Ceramide spontan assoziieren und selbst Mikrodomänen in der Membran bilden, die Signalmoleküle anreichern und rezeptorvermittelte Signalprozesse verstärken können (Kolesnick, 2000; Zhang *et al.*, 2008).

Unveröffentlichte Arbeiten zeigen, dass eine Behandlung von RLE-6TN Zellen für 5 min mit 10 µg/cm<sup>2</sup> ufCB einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der



Mikrodomänen hat. Die Partikel induzieren eine Zunahme des Lipidmediators Ceramid in Lipid Rafts. Zudem wurde eine Verringerung des Gehaltes an Cholesterin beobachtet (Arbeiten von Dr. Grether-Beck, AG Zellbiologie, IUF).

In der vorliegenden Arbeit konnte in RLE-6TN Zellen durch externe Zugabe des zellpermeablen Ceramid-Analogons C<sub>6</sub> die durch ufCB induzierte Translokation von SFK und EGF-R nachgeahmt werden. Es zeigte sich hier auch, dass C<sub>6</sub>-Ceramid im gleichen Ausmaß wie ufCB eine Translokation von SFK und EGF-R aus der Raft-Region induziert. Nach einer 15-minütigen Behandlung mit C<sub>6</sub>-Ceramid sind in der Raft-Fraktion nur noch 3,6 % SFK bzw. 6,5 % des EGF-R in diesen G<sub>M</sub>1-reichen Domänen nachweisbar (Abb 3.18). Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die externe Zugabe von Ceramiden die Aktivierung der Signalproteine SFK und Erk1/2 induziert und zwar in einem ähnlichen Ausmaß, wie ufCB deren Phosphorylierung bewirkt (Abb. 3.19 und 3.20). Dabei schädigt die eingesetzte Konzentration von C<sub>6</sub>-Ceramid nicht die Zellmembranen, womit ausgeschlossen werden kann, dass die induzierte Phosphorylierung von SFK und Erk1/2 auf behandlungsbedingte zytotoxische Effekte zurückzuführen ist (Abb. 3.16). Auch andere Arbeiten zeigen, dass Ceramide die Aktivierung von Signalproteinen beeinflussen können. Durch LPS kann in alveolaren Makrophagen die Freisetzung von Ceramiden induziert werden, was in der Aktivierung des PI3-K/Akt Signalweges resultiert. Dies trägt zum Überleben der Zellen bei (Monick *et al.*, 2001). Die externe Zugabe von Ceramiden induziert die Aktivierung von SFK, Erk1/2 und PI3-K bei der Kontraktion isolierter Muskelzellen des Colons (Ibitayo *et al.*, 1998). Die beschriebenen Studien unterstreichen die Bedeutung von Ceramiden als *second messenger* bei Signalprozessen, die zur Ausprägung unterschiedlicher Endpunkte führen. Die Bildung von Ceramiden nach Partikelbelastung, die eine Translokation von SFK und EGF-R zusammen mit der Aktivierung von SFK und Erk1/2 in RLE-6TN Zellen induziert, lassen vermuten, dass diese Lipidmediatoren eine entscheidende Funktion bei der Initiation proliferativer Signalwege haben. Nach Behandlung mit Ceramiden wurde neben der Translokation von Signalproteinen aus der Raft-Fraktion ebenfalls eine signifikante Verringerung in der Nicht-Raft-Fraktion beobachtet. Hier kann angenommen werden, dass C<sub>6</sub>-Ceramid auch einen Einfluss hat auf die Aktivierung von SFK und EGF-R in der Nicht-Raft-Fraktion, wonach diese dann vermehrt abgebaut werden.

In weiteren Versuchen muss geklärt werden, wie die Ceramide nach Belastung mit ufCB gebildet werden. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass ROS die an der Ceramidbildung beteiligte saure Sphingomyelinase aktivieren können (Dumitru *et al.*, 2007). Auch für die neutrale Sphingomyelinase (nSMase) konnte eine Beteiligung von ROS an der Aktivierung des Enzyms beschrieben werden, die durch NAC inhibiert werden konnte (Mansat-de Mas *et al.*, 1999). Zudem beobachtete Martin *et al.*, (2007) dass steigende Level von GSSG und eine Reduzierung von GSH die Aktivität von nSMasen moduliert. Nach Partikelbelastung in RLE-6TN Zellen wäre ebenfalls eine durch ROS induzierte Ceramidproduktion denkbar. Hier wurden ja bereits nach 5-minütiger Belastung mit ufCB die Produktion von ROS und gleichzeitig eine Reduktion des Gehaltes an Sphingomyelin in den Rafts detektiert (Weissenberg *et al.*, 2010; unveröffentlichte Arbeiten von Dr.Grether-Beck). Mit Hilfe von Antioxidantien muss in weiteren Versuchen eine Beteiligung von ROS an der Ceramidbildung bzw. der Ceramid-induzierten Aktivierung von Signalmolekülen untersucht werden.

Zusammenfassend deuten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die nach Belastung mit ufCB induzierte Produktion von Ceramiden ein entscheidender Schritt ist bei der Initiation der proliferativen Signalkaskade in RLE-6TN Zellen.

#### **4.6 Wirkung von Ectoin auf die partikelinduzierte Translokation von SFK und EGF-R aus Rafts**

Substanzen mit protein- und membranstabilisierenden Eigenschaften haben einen Einfluss auf die Aktivierung von Signalproteinen (Sydlik *et al.*, 2009). Dazu zählt das Ectoin, ein Aminosäurederivat, welches zur Gruppe der kompatiblen Solute gehört. Die organische, niedermolekulare Substanz tritt in halophilen Bakterien auf (Galinski *et al.*, 1985). Die Akkumulation von Ectoin ermöglicht diesen Organismen, an extremophilen Standorten zu überleben. Ectoin ist ein Osmolyt, d.h. es hält den osmotischen Druck in der Zelle auf dem Niveau des externen Mediums, um Osmose zu verhindern. Die Substanz kann hohe zytoplasmatische Konzentrationen erreichen, ohne Makromoleküle zu schädigen oder physiologische Prozesse der Zelle zu stören und wird daher als kompatibles Solut bezeichnet. Diese Solute zeigen einen

stabilisierenden Effekt auf Proteine und Membranen (Yancey, 2005; Arakawa & Timasheff, 1985). Dieser Effekt kann auch in Organismen beobachtet werden, die sonst keine Osmolyte nutzen und ist damit universell (Yancey *et al.*, 1982). Die proteinstabilisierende Funktion wird durch das „*preferential exclusion model*“ beschrieben, wobei der exakte Mechanismus noch unvollständig verstanden ist. Danach binden stabilisierende Solute nicht an Proteine, sondern werden von der Hydrathülle des Proteins ausgeschlossen (Arakawa & Timasheff, 1985; Timasheff, 1992). Dieser „osmophobe“ Effekt resultiert aus der Abstoßung zwischen Solut und Protein-Rückgrat (Bolen & Baskakov, 2001). Durch diese Abstoßung falten sich die Proteine kompakter, da dadurch die thermodynamisch ungünstige Interaktion mit dem kompatiblen Solut verringert wird. Die native Konformation wird dadurch stabilisiert (Yancey, 2005).

Es konnte beobachtet werden, dass Ectoin einen präventiven Effekt auf durch Umweltstimuli induzierte pathogene Endpunkte besitzt. In *in vivo*-Studien verringert Ectoin die durch ufCB-induzierte neutrophile Entzündung in der Rattenlunge. Hier wurde *in vivo* auch eine Verringerung der durch ufCB induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 detektiert. Diese konnte auch in Zellkultur nach einer 4-stündigen Vorinkubation von RLE-6TN Zellen mit Ectoin und anschließender Belastung mit ufCB beobachtet werden (Sydlik *et al.*, 2009). In unveröffentlichten Arbeiten der Firma bitop (Witten) konnte gezeigt werden, dass Ectoin nicht in Lungenepithelzellen aufgenommen wird. Es werden darum extrazelluläre Wirkmechanismen, die zu einer Stabilisierung von Membranstrukturen beitragen, diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die partikelinduzierte Translokation von SFK und EGF-R nach einer 4-stündigen Vorinkubation mit Ectoin verhindert werden kann (Abb. 3.22 und 3.23). Zusätzlich ist Ectoin in der Lage, die durch ufCB-induzierte Aktivierung von SFK auf Kontrolllevel zu reduzieren (Abb. 3.24). Der molekulare Mechanismus dieser Inhibierung von partikelinduzierten Signalwegen ist noch nicht verstanden. Ectoin wirkt nicht als Antioxidanz, wie einige andere kompatible Solute (Yancey, 2005). Wahrscheinlich spielt hier die Fähigkeit kompatibler Solute, Makromoleküle zu stabilisieren eine entscheidende Rolle. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Substanzen, die nicht als kompatible Solute wirken wie z.B. Harnstoff, keine Effekte auf die partikelinduzierte Phosphorylierung von Signalproteinen zeigen (Sydlik *et al.*, 2009). Harnstoff ist zwar ebenfalls eine

osmotisch wirksame Substanz, bindet aber direkt an das Protein, welches daraufhin denaturiert (Bennion & Daggett, 2003; Yancey, 2005).

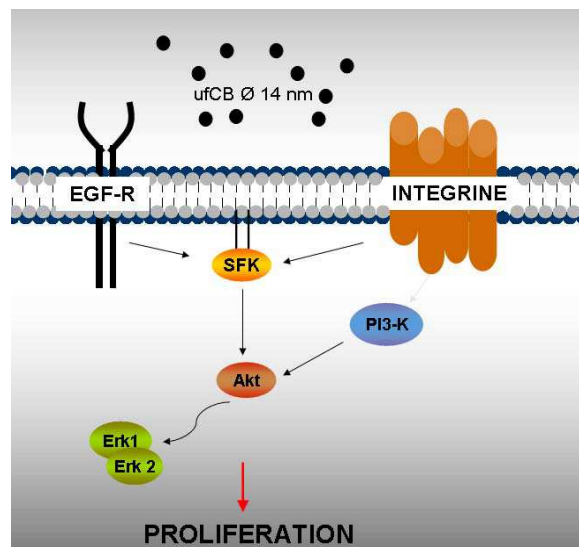
Ectoin verhindert in der vorliegenden Arbeit eine Translokation von SFK und EGF-R aus der Raft-Region und hat damit möglicherweise auch hier einen stabilisierenden Effekt auf diese Domänen. In Modellmembranen erhöht Ectoin die Fluidität und kann so möglicherweise durch Modulierung von Membrankomponenten einen Einfluss auf Signalprozesse haben (Harishchandra *et al.*, 2010). Präventive Effekte von Ectoin können ebenfalls auf die durch UVA-Bestrahlung induzierte Ceramidbildung in Keratinozyten beobachtet werden, wodurch die Substanz mit Signalprozessen interferieren kann, die auf Membranebene initiiert werden (Grether-Beck *et al.*, 2005). Möglicherweise hat Ectoin in der vorliegenden Arbeit ebenfalls einen Effekt auf die Ceramidbildung, die ja nach Partikelbelastung detektiert wurde. Somit könnten Signalprozesse inhibiert werden, was sich in der Verringerung der Phosphorylierung von SFK in der vorliegenden Arbeit widerspiegelt. Diese Hypothese muss durch Ceramidmessungen nach Vorinkubation mit Ectoin und anschließender Partikelbelastung überprüft werden. Zusätzlich könnte Ectoin wie oben beschrieben die Signalproteine selbst stabilisieren, so dass sie nach Partikelbelastung in Raft-Bereichen verbleiben. Nach Vorinkubation mit Ectoin und anschließender Belastung ist ein Anstieg des Gehaltes von SFK und EGF-R in der Raft-Fraktion, aber auch in der Nicht-Raft-Fraktion zu erkennen. Das könnte ein Hinweis drauf sein, dass Ectoin die Proteine stabilisiert und so möglicherweise deren Abbau verhindert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Ectoin einen modulierenden Effekt auf durch ufCB-induzierte Signalereignisse ausübt. Das könnte zur Prävention von partikelinduzierten Signalprozessen beitragen, die zu pathogenen Endpunkten wie Apoptose, Proliferation und Entzündung führen.

#### **4.7 Einordnung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit hebt die Bedeutung der Membran bei partikelinduzierten proliferativen Signalprozessen in Lungenepithelzellen hervor. Sie setzt damit in einer Linie mit zuvor veröffentlichten Studien, die eine Beteiligung der Membranrezeptoren EGF-R und  $\beta$ 1-Integrine und des Membran-abhängigen PI3-K/Akt Signalweges

darlegen, deren Aktivität für die Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 entscheidend ist. Aufbauend auf diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass verbrennungsgenerierte ultrafeine Partikel Membran-assoziierte SFK aktivieren. Diese konnten *downstream* der Membranrezeptoren lokalisiert werden und ihre Aktivität ist für die Phosphorylierung von Erk1/2 und Akt maßgeblich; speziell die c-Src Kinase hat eine grundlegende Funktion bei der Aktivierung von Akt (Abb. 4.1).

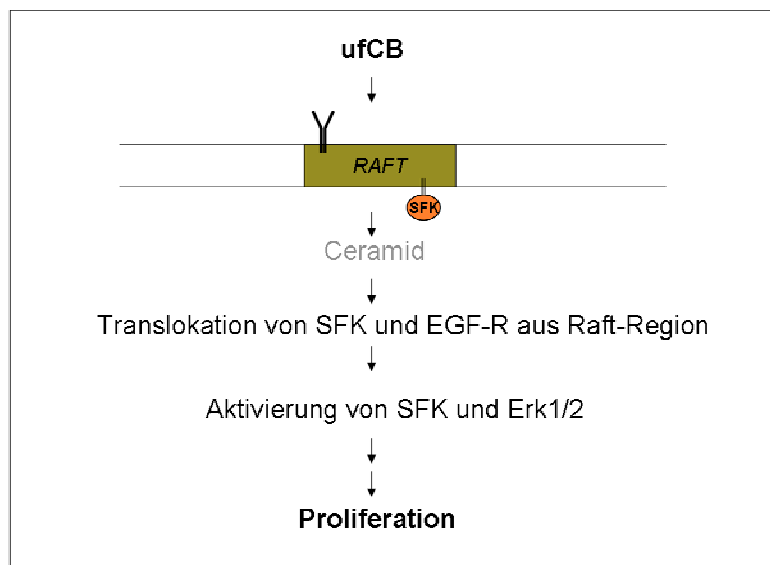


**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Rolle von SFK bei der partikelinduzierten Proliferation in Lungenepithelzellen. SFK konnten *downstream* von den Membranrezeptoren EGF-R und  $\beta$ 1-Integrinen lokalisiert werden. Die Aktivität von SFK ist essentiell für die Phosphorylierung von Akt und Erk1/2 bei der proliferativen Signaltransduktion.

Die SFK und der EGF-R konnten in unbehandelten RLE-6TN Zellen in Lipid Rafts lokalisiert werden. Nach Belastung mit ufCB können beide Signalproteine nur noch zu einem geringen Prozentsatz in diesen Domänen detektiert werden. Dabei sind die Translokation sowie die Aktivierung der Signalproteine Nanopartikel-spezifisch, da feine CB-Partikel keinen Einfluss auf diese Signalprozesse haben. Einhergehend mit einer Proteinänderung in Lipid Rafts wurde in unveröffentlichten Arbeiten die Bildung des *second messengers* Ceramid nach Partikelbelastung beobachtet. In der vorliegenden Arbeit induzierten Ceramide in einem ähnlichen Ausmaß wie ufCB nach Behandlung der RLE-6TN Zellen eine Translokation der Signalproteine SFK und EGF-R aus der Raft-Region. Zudem sind diese Lipidmediatoren in der Lage, SFK und Erk1/2 zu aktivieren. Diese Befunde lassen sich in folgendem Schema

zusammenfassen (Abb. 4.2): Danach ist die partikelinduzierte Ceramidbildung entscheidend für die Translokation von SFK und EGF-R aus der Raft-Region und die Aktivierung der Signalmoleküle Erk1/2 und SFK. Ectoin als kompatibles Solut wirkt auf diesen Signalweg protektiv. Weiterführende Studien müssen zeigen, ob die hier beobachtete Veränderung der Mikrodomänen auch in anderen Epithelzellen nach Belastung mit Nanopartikeln detektiert werden kann und dies vielleicht ein genereller Mechanismus der partikelinduzierten proliferativen Signaltransduktion ist. Diese Kenntnis ist u.a. auch im Zuge des vermehrten Einsatzes von Nanopartikeln in Lebensmitteln und deren Wirkung auf Darmzellen von Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit leistet damit einen Beitrag zum Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der partikelinduzierten Proliferation in Lungenepithelzellen. Die Aufklärung dieser Mechanismen hat vor dem Hintergrund der aktuellen Feinstaubproblematik und dem wachsenden Einsatz von Nanopartikeln im Bereich der Nanotechnologie einen hohen Stellenwert.



**Abb. 4.2:** Modellvorstellung zur partikelinduzierten Initiation der Proliferation in RLE-6TN Zellen. Die durch eine Belastung mit ufCB induzierte Bildung von Ceramiden ist essentiell für die Translokation und Aktivierung der Signalproteine.

## 5. Zusammenfassung

Inhalierbare ultrafeine Partikel induzieren pathogene Endpunkte wie Apoptose oder Proliferation in Lungenepithelzellen. Partikelinduzierte Signalprozesse werden dabei auf Ebene der Membran unter Beteiligung von Rezeptoren ausgelöst.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Membran-assoziierte Src-Familie-Kinasen (SFK) in Lungenepithelzellen (RLE-6TN) nach einer Belastung mit ultrafeinen Partikeln aktiviert werden und die Verbindung zwischen Membranrezeptoren und der proliferativen Signaltransduktion über Proteinkinase B und MAP-Kinase Erk1/2 herstellen. Die Relevanz von c-Src bei diesen Ereignissen wurde durch siRNA-Experimente betätigt. Zudem konnte mittels pharmakologischer Inhibitoren für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) sowie für Integrine nachgewiesen werden, dass diese Transmembranrezeptoren die Aktivität von Src-Familie-Kinasen beeinflussen.

Durch ultrafeine Partikel ausgelöste Signalereignisse lassen sich auf Membranebene in Form von Veränderungen in Mikrodomänen (Lipid Rafts) nachweisen. Nach biochemischer Isolierung von Lipid Rafts aus RLE-6TN Zellen zeigte sich, dass ultrafeine Partikel mit einem Durchmesser von 14 nm eine Translokation von SFK und EGF-R aus diesen Mikrodomänen induzieren, ohne diese zu zerstören. Durch den Einsatz feiner Partikel konnte bestätigt werden, dass dieser Effekt abhängig ist von der Partikelgröße: Feine Partikel mit einem Durchmesser von 260 nm sind nicht in der Lage, eine Translokation von SFK und EGF-R sowie eine Aktivierung von SFK zu induzieren.

Eine Beteiligung von Ceramiden, die durch Belastung mit ultrafeinen Partikeln in Lipid Rafts entstehen, an der proliferativen Signaltransduktion wird durch Zugabe von Ceramid-Analoga demonstriert. Diese induzieren die Translokation und Aktivierung von Signalproteinen im selben Ausmaß wie ultrafeine Partikel. Eine Stabilisierung von Membranstrukturen durch das kompatible Solut Ectoin verhindert die partikelinduzierte Translokation von SFK und EGF-R sowie die Aktivierung von SFK und zeigt damit protektive Eigenschaften bei der durch ultrafeine Partikel induzierten Proliferation.

## 6. Summary

Ultrafine particles with a diameter below 100 nm induce pathogenic endpoints like apoptosis and proliferation in lung epithelial cells via induction of different signaling pathways. On the level of the membrane, epidermal growth factor receptor (EGF-R) and integrins are involved in proliferative signaling pathways.

In the present thesis, ultrafine particles induce the activation of membrane-associated Src-Family-Kinases (SFK) in rat lung epithelial cells (RLE-6TN). These kinases mediate the crosstalk between membrane receptors and *downstream* activated MAP-kinases Erk1/2 and proteinkinase B. Using siRNA, it was shown that c-Src as one member of Src-Family-Kinases is essential in the particle-induced proliferative pathway. Furthermore, SFK depend on the activation of the membrane receptors EGF-R and integrins which was demonstrated by using pharmacological inhibitors for both receptors.

Signaling proteins are enriched in membrane microdomains known as lipid rafts which act as signaling platforms. Biochemical isolation of these structures in RLE-6TN cells using Triton X-100 revealed an association of SFK and EGF-R with these microdomains. Treatment of cells with ultrafine particles ( $\emptyset$  14 nm) induced a depletion of SFK and EGF-R out of lipid rafts. This effect proved to be dependent on the particle size. Fine particles with a diameter of 260 nm failed to induce the depletion of SFK as well as EGF-R and an activation of SFK.

The causal link between a particle-induced release of *second messenger* ceramide and initial effects on signaling proteins was investigated by adding external ceramide, which induced a reduction of SFK and EGF-R in the lipid raft fraction. Moreover, external ceramides activate the signaling proteins SFK and Erk1/2. These results support the hypothesis that the generation of ceramide within microdomains is an initial event leading to the depletion and activation of proteins crucial for the proliferative signaling pathway. The membrane stabilizing compatible solute Ectoine protects the cells from particle-induced activation of signaling proteins and depletion of SFK and EGF-R out of lipid rafts.



## Literatur

ImageJ, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Abdelmohsen, K., P. A. Gerber, C. von Montfort, H. Sies, and L. O. Klotz. 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, no. 40: 38360-38367.

Abraham, E. 2005. Akt/Protein Kinase B. *Crit Care Med.* 33, no. 12 Suppl: S420-S422.

Abramoff MD, Magelhaes PJ, and Ram SJ. 2004. Image Processing With ImageJ. *Biophotonics International* 11, no. 7: 36-42.

Alberts, B, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson JD. 1995. "Die Innere Organisation Der Zelle, in *Molekularbiologie der Zelle*, 3, vol. III: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 563-597.

Albrecht, C, P. J. Borm, and K. Unfried. 2004. Signal Transduction Pathways Relevant for Neoplastic Effects of Fibrous and Non-Fibrous Particles. *Mutat.Res.* 553, no. 1-2: 23-35.

Anderson, P. J., J. D. Wilson, and F. C. Hiller. 1990. Respiratory Tract Deposition of Ultrafine Particles in Subjects With Obstructive or Restrictive Lung Disease. *Chest* 97, no. 5: 1115-1120.

Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari, and R. L. Juliano. 1998. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: the Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins. *Pharmacol.Rev.* 50, no. 2: 197-263.

Arakawa, T. and S. N. Timasheff. 1985. The Stabilization of Proteins by Osmolytes. *Biophys.J.* 47, no. 3: 411-414.

Babuke, T. and R. Tikkanen. 2007. Dissecting the Molecular Function of Reggie/Flotillin Proteins. *Eur.J.Cell Biol.* 86, no. 9: 525-532.

Baird, B., E. D. Sheets, and D. Holowka. 1999. How Does the Plasma Membrane Participate in Cellular Signaling by Receptors for Immunoglobulin E? *Biophys.Chem.* 82, no. 2-3: 109-119.

Balashazy, I., W. Hofmann, and T. Heistracher. 2003. Local Particle Deposition Patterns May Play a Key Role in the Development of Lung Cancer. *J.Appl.Physiol* 94, no. 5: 1719-1725.

Balbis, A. and B. I. Posner. 2010. Compartmentalization of EGFR in Cellular Membranes: Role of Membrane Rafts. *J.Cell Biochem.* 109, no. 6: 1103-1108.

- Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, no. 1: 269-280.
- Barthel, A. and L. O. Klotz. 2005. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling in the Cellular Response to Oxidative Stress. *Biol.Chem.* 386, no. 3: 207-216.
- Beck-Speier, I., N. Dayal, E. Karg, K. L. Maier, G. Schumann, H. Schulz, M. Semmler, S. Takenaka, K. Stettmaier, W. Bors, A. Ghio, J. M. Samet, and J. Heyder. 2005. Oxidative Stress and Lipid Mediators Induced in Alveolar Macrophages by Ultrafine Particles. *Free Radic.Biol.Med.* 38, no. 8: 1080-1092.
- Bennion, B. J. and V. Daggett. 2003. The Molecular Basis for the Chemical Denaturation of Proteins by Urea. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, no. 9: 5142-5147.
- Bernstein, E., A. M. Denli, and G. J. Hannon. 2001. The Rest Is Silence. *RNA.* 7, no. 11: 1509-1521.
- BeruBe, K., D. Balharry, K. Sexton, L. Koshy, and T. Jones. 2007. Combustion-Derived Nanoparticles: Mechanisms of Pulmonary Toxicity. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 34, no. 10: 1044-1050.
- Biscardi, Jacqueline S., Ming Chei Maa, David A. Tice, Michael E. Cox, Tzeng Horne Leu, and Sarah J. Parsons. 1999. C-Src-Mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated With Modulation of Receptor Function. *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 12: 8335-8343.
- Blanchet, Sophie, Kiran Ramgolam, Augustin Baulig, Francelyne Marano, and Armelle Baeza-Squiban. 2004. Fine Particulate Matter Induces Amphiregulin Secretion by Bronchial Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30, no. 4: 421-427.
- Boesze-Battaglia, K. and R. Schimmel. 1997. Cell Membrane Lipid Composition and Distribution: Implications for Cell Function and Lessons Learned From Photoreceptors and Platelets. *J.Exp.Biol.* 200, no. Pt 23: 2927-2936.
- Bolen, D. W. and I. V. Baskakov. 2001. The Osmophobic Effect: Natural Selection of a Thermodynamic Force in Protein Folding. *J.Mol.Biol.* 310, no. 5: 955-963.
- Borm, P. J., R. P. Schins, and C. Albrecht. 2004. Inhaled Particles and Lung Cancer, Part B: Paradigms and Risk Assessment. *Int.J.Cancer* 110, no. 1: 3-14.
- Bouwmeester, Hans, Susan Dekkers, Maryvon Y. Noordam, Werner I. Hagens, Astrid S. Bulder, Cees de Heer, Sandra E. C. G. ten Voorde, Susan W. P. Wijnhoven, Hans J. P. Marvin, and Adriënnne J. A. M. Sips. 2009. Review of Health Safety Aspects of Nanotechnologies in Food Production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53, no. 1: 52-62.
- Bradshaw, J. Michael. 2010. The Src, Syk, and Tec Family Kinases: Distinct Types of Molecular Switches. *Cellular Signalling* 22, no. 8: 1175-1184.

- Bretscher, M. S. 1973. Membrane Structure: Some General Principles. *Science* 181, no. 100: 622-629.
- Brown, D. and G. L. Waneck. 1992. Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins. *Journal of the American Society of Nephrology* 3, no. 4: 895-906.
- Brown, D. A., B. Crise, and J. K. Rose. 1989. Mechanism of Membrane Anchoring Affects Polarized Expression of Two Proteins in MDCK Cells. *Science* 245, no. 4925: 1499-1501.
- Brown, Deborah A. and John K. Rose. 1992. Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains During Transport to the Apical Cell Surface. *Cell* 68, no. 3: 533-544.
- Brown, M. T. and J. A. Cooper. 1996. Regulation, Substrates and Functions of Src. *Biochim.Biophys.Acta* 1287, no. 2-3: 121-149.
- Cabodi, S., P. Di Stefano, Mdel P. Leal, A. Tinnirello, B. Bisaro, V. Morello, L. Damiano, S. Aramu, D. Repetto, G. Tornillo, and P. Defilippi. 2010. Integrins and Signal Transduction. *Adv.Exp.Med.Biol.* 674: 43-54.
- Campbell, Lee, Andrew J. Hollins, Ahmed Al Eid, Geoff R. Newman, Chris von Ruhland, and Mark Gumbleton. 1999. Caveolin-1 Expression and Caveolae Biogenesis During Cell Transdifferentiation in Lung Alveolar Epithelial Primary Cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262, no. 3: 744-751.
- Cao, D., T. L. Tal, L. M. Graves, I. Gilmour, W. Linak, W. Reed, P. A. Bromberg, and J. M. Samet. 2007. Diesel Exhaust Particulate-Induced Activation of Stat3 Requires Activities of EGFR and Src in Airway Epithelial Cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 292, no. 2: L422-L429.
- Chen, A. and V. T. Moy. 2000. Cross-Linking of Cell Surface Receptors Enhances Cooperativity of Molecular Adhesion. *Biophys.J.* 78, no. 6: 2814-2820.
- Cheresh, D. A. 1987. Human Endothelial Cells Synthesize and Express an Arg-Gly-Asp-Directed Adhesion Receptor Involved in Attachment to Fibrinogen and Von Willebrand Factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, no. 18: 6471-6475.
- Choksi, A. N., T. Poonawalla, and M. G. Wilkerson. 2010. Nanoparticles: a Closer Look at Their Dermal Effects. *J.Drugs Dermatol.* 9, no. 5: 475-481.
- Cobb, M. H. and E. J. Goldsmith. 1995. How MAP Kinases Are Regulated. *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 25: 14843-14846.
- Damjanovich, S., R. Gaspar, Jr., and C. Pieri. 1997. Dynamic Receptor Superstructures at the Plasma Membrane. *Q.Rev.Biophys.* 30, no. 1: 67-106.

- Datta, K., A. Bellacosa, T. O. Chan, and P. N. Tsichlis. 1996. Akt Is a Direct Target of the Phosphatidylinositol 3-Kinase. Activation by Growth Factors, V-Src and V-Ha-Ras, in Sf9 and Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 271, no. 48: 30835-30839.
- Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, and S. Dedhar. 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, no. 19: 11211-11216.
- Denison, M. S. and S. R. Nagy. 2003. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43: 309-334.
- Dockery, D. W., C. A. Pope, III, X. Xu, J. D. Spengler, J. H. Ware, M. E. Fay, B. G. Ferris, Jr., and F. E. Speizer. 1993. An Association Between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities. *N.Engl.J.Med.* 329, no. 24: 1753-1759.
- Donaldson, K, V.Stone, A.Clouter, L.Renwick, and W.MacNee. 2001. Ultrafine Particles. *Occup.Environ.Med.* 58, no. 3: 211-6, 199.
- Donaldson, K. and V. Stone. 2003. Current Hypotheses on the Mechanisms of Toxicity of Ultrafine Particles. *Ann Ist Super Sanita.* 39, no. 3: 405-410.
- Donaldson, K., L. Tran, L. A. Jimenez, R. Duffin, D. E. Newby, N. Mills, W. MacNee, and V. Stone. 2005. Combustion-Derived Nanoparticles: a Review of Their Toxicology Following Inhalation Exposure. *Part Fibre.Toxicol.* 2: 10.
- Driscoll, K. E., J. M. Carter, P. T. Iype, H. L. Kumari, L. L. Crosby, M. J. Aardema, R. J. Isfort, D. Cody, M. H. Chestnut, J. L. Burns, and . 1995. Establishment of Immortalized Alveolar Type II Epithelial Cell Lines From Adult Rats. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 31, no. 7: 516-527.
- Dumitru, C. A., Y. Zhang, X. Li, and E. Gulbins. 2007. Ceramide: a Novel Player in Reactive Oxygen Species-Induced Signaling? *Antioxid.Redox.Signal.* 9, no. 9: 1535-1540.
- Eggeling, C., C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V. N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, and S. W. Hell. 2009. Direct Observation of the Nanoscale Dynamics of Membrane Lipids in a Living Cell. *Nature* 457, no. 7233: 1159-1162.
- Farooqui, Akhlaq A. 2009. Lipid Mediators in the Neural Cell Nucleus: Their Metabolism, Signaling, and Association With Neurological Disorders. *The Neuroscientist* 15, no. 4: 392-407.
- Fayard, E., G. Xue, A. Parcellier, L. Bozulic, and B. A. Hemmings. 2010. Protein Kinase B (PKB/Akt), a Key Mediator of the PI3K Signaling Pathway. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*
- Ferin, J. 1994. Pulmonary Retention and Clearance of Particles. *Toxicol.Lett.* 72, no. 1-3: 121-125.

- Fickova, M. 2002. Structure and Activation of EGF Receptor: Minireview. *Endocr.Regul.* 36, no. 2: 87-93.
- Fiedler, S., J. Broecker, and S. Keller. 2010. Protein Folding in Membranes. *Cell Mol.Life Sci.* 67, no. 11: 1779-1798.
- Foster, L. J., C. L. De Hoog, and M. Mann. 2003. Unbiased Quantitative Proteomics of Lipid Rafts Reveals High Specificity for Signaling Factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, no. 10: 5813-5818.
- Fubini, Bice and Andrea Hubbard. 2003. Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) Generation by Silica in Inflammation and Fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine* 34, no. 12: 1507-1516.
- Fyrst, Henrik and Julie D. Saba. 2010. An Update on Sphingosine-1-Phosphate and Other Sphingolipid Mediators. *Nat Chem Biol* 6, no. 7: 489-497.
- Gagnoux-Palacios, Laurent, Michael Dans, Wouter van't Hof, Agnese Mariotti, Angela Pepe, Guerrino Meneguzzi, Marilyn D. Resh, and Filippo G. Giancotti. 2003. Compartmentalization of Integrin  $\{\text{Alpha}\}_6\{\text{Beta}\}_4$  Signaling in Lipid Rafts. *The Journal of Cell Biology* 162, no. 7: 1189-1196.
- Galinski, E. A., H. P. Pfeiffer, and H. G. Truper. 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-Methyl-4-Pyrimidinecarboxylic Acid. A Novel Cyclic Amino Acid From Halophilic Phototrophic Bacteria of the Genus *Ectothiorhodospira*. *Eur.J.Biochem.* 149, no. 1: 135-139.
- Geiser, M., B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schurch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, Hof Im, V, J. Heyder, and P. Gehr. 2005. Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ.Health Perspect.* 113, no. 11: 1555-1560.
- Ghio, A. J., J. Zhang, and C. A. Piantadosi. 1992. Generation of Hydroxyl Radical by Crocidolite Asbestos Is Proportional to Surface  $[\text{Fe}^{3+}]$ . *Arch.Biochem.Biophys.* 298, no. 2: 646-650.
- Gianni, Davide, Ben Bohl, Sara A. Courtneidge, and Gary M. Bokoch. 2008. The Involvement of the Tyrosine Kinase C-Src in the Regulation of Reactive Oxygen Species Generation Mediated by NADPH Oxidase-1. *Molecular Biology of the Cell* 19, no. 7: 2984-2994.
- Giannoni, E., F. Buricchi, G. Raugei, G. Ramponi, and P. Chiarugi. 2005. Intracellular Reactive Oxygen Species Activate Src Tyrosine Kinase During Cell Adhesion and Anchorage-Dependent Cell Growth. *Mol.Cell Biol.* 25, no. 15: 6391-6403.
- Giannoni, E., F. Buricchi, G. Grimaldi, M. Parri, F. Cialdai, M. L. Taddei, G. Raugei, G. Ramponi, and P. Chiarugi. 2008. Redox Regulation of Anoikis: Reactive Oxygen Species As Essential Mediators of Cell Survival. *Cell Death.Differ.* 15, no. 5: 867-878.

- Giannoni, Elisa, Maria Letizia Taddei, and Paola Chiarugi. 2010. Src Redox Regulation: Again in the Front Line. *Free Radical Biology and Medicine* 49, no. 4: 516-527.
- Gilmour, Peter S., Axel Ziesenis, E. Rona Morrison, Mark A. Vickers, Ellen M. Drost, Isobel Ford, Erwin Karg, Claudia Mossa, Andreas Schroepel, George A. Ferron, Joachim Heyder, Michael Greaves, William MacNee, and Kenneth Donaldson. 2004. Pulmonary and Systemic Effects of Short-Term Inhalation Exposure to Ultrafine Carbon Black Particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 195, no. 1: 35-44.
- Grether-Beck, S., G. Bonizzi, H. Schmitt-Brenden, I. Felsner, A. Timmer, H. Sies, J. P. Johnson, J. Piette, and J. Krutmann. 2000. Non-Enzymatic Triggering of the Ceramide Signalling Cascade by Solar UVA Radiation. *EMBO J.* 19, no. 21: 5793-5800.
- Grether-Beck, S., A. Timmer, I. Felsner, H. Brenden, D. Brammertz, and J. Krutmann. 2005. Ultraviolet A-Induced Signaling Involves a Ceramide-Mediated Autocrine Loop Leading to Ceramide De Novo Synthesis. *J. Invest Dermatol.* 125, no. 3: 545-553.
- Grether-Beck, S., M. Salahshour-Fard, A. Timmer, H. Brenden, I. Felsner, R. Walli, J. Fullekrug, and J. Krutmann. 2008. Ceramide and Raft Signaling Are Linked With Each Other in UVA Radiation-Induced Gene Expression. *Oncogene* 27, no. 35: 4768-4778.
- Handler, J. S. 1989. Overview of Epithelial Polarity. *Annu. Rev. Physiol* 51: 729-740.
- Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok, and P. A. Connelly. 1996. Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. Study of Lck- and FynT-Dependent T Cell Activation. *Journal of Biological Chemistry* 271, no. 2: 695-701.
- Hannun, Y. A. and C. Luberto. 2000. Ceramide in the Eukaryotic Stress Response. *Trends Cell Biol.* 10, no. 2: 73-80.
- Hannun, Y. A., C. Luberto, and K. M. Argraves. 2001. Enzymes of Sphingolipid Metabolism: From Modular to Integrative Signaling. *Biochemistry* 40, no. 16: 4893-4903.
- Hanzal-Bayer, M. F. and J. F. Hancock. 2007. Lipid Rafts and Membrane Traffic. *FEBS Lett.* 581, no. 11: 2098-2104.
- Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components. *The Journal of Cell Biology* 141, no. 4: 929-942.
- Harishchandra, Rakesh Kumar, Stephanie Wulff, Georg Lentzen, Thorsten Neuhaus, and Hans Joachim Galla. 2010. The Effect of Compatible Solute Ectoin on the Structural Organization of Lipid Monolayer and Bilayer Membranes. *Biophysical Chemistry* 150, no. 1-3: 37-46.

- Harris, Kimya F., Ikuo Shoji, Eric M. Cooper, Sushant Kumar, Hideaki Oda, and Peter M. Howley. 1999. Ubiquitin-Mediated Degradation of Active Src Tyrosine Kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, no. 24: 13738-13743.
- Herbst, Roy S. 2004. Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 59, no. 2, Supplement 1: S21-S26.
- Hess, Samuel T., Travis J. Gould, Manasa V. Gudheti, Sarah A. Maas, Kevin D. Mills, and Joshua Zimmerberg. 2007. Dynamic Clustered Distribution of Hemagglutinin Resolved at 40 Nm in Living Cell Membranes Discriminates Between Raft Theories. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, no. 44: 17370-17375.
- Hoekstra, Dick, Olaf Maier, Johanna M. van der Wouden, Tounsia Ait Slimane, and Sven C. D. van IJzendoorn. 2003. Membrane Dynamics and Cell Polarity: the Role of Sphingolipids. *Journal of Lipid Research* 44, no. 5: 869-877.
- Hofman, Erik G., Mika O. Ruonala, Arjen N. Bader, Dave van den Heuvel, Jarno Voortman, Rob C. Roovers, Arie J. Verkleij, Hans C. Gerritsen, and Paul van Bergen en Henegouwen. 2008. EGF Induces Coalescence of Different Lipid Rafts. *Journal of Cell Science* 121, no. 15: 2519-2528.
- Hui, S. W. and D. F. Parsons. 1975. Direct Observation of Domains in Wet Lipid Bilayers. *Science* 190, no. 4212: 383-384.
- Ibitayo, Adenike I., Yasuhiro Tsunoda, Fumihiko Nozu, Chung Owyang, and Khalil N. Bitar. 1998. Src Kinase and PI 3-Kinase As a Transduction Pathway in Ceramide-Induced Contraction of Colonic Smooth Muscle. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology* 275, no. 4: G705-G711.
- Ishizawar, R. and S. J. Parsons. 2004. C-Src and Cooperating Partners in Human Cancer. *Cancer Cell* 6, no. 3: 209-214.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat. 2002. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and P38 Protein Kinases. *Science* 298, no. 5600: 1911-1912.
- Jones, C. F. and D. W. Grainger. 2009. In Vitro Assessments of Nanomaterial Toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, no. 6: 438-456.
- Kang, Jihee Lee, Hae J. Jung, Kyungeun Lee, and Hyung R. Kim. 2006. Src Tyrosine Kinases Mediate Crystalline Silica-Induced NF- $\kappa$ B Activation Through Tyrosine Phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and P65 NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 Macrophages. *Toxicological Sciences* 90, no. 2: 470-477.
- Karlson, Peter, Doenecke Detlef, and Fuchs Georg Gerok Wolfgang Koolman Jan. 2005. *Biochemie Und Pathobiochemie*, 15, Thieme-Verlag.

- Karnovsky, M. J., A. M. Kleinfeld, R. L. Hoover, and R. D. Klausner. 1982. The Concept of Lipid Domains in Membranes. *The Journal of Cell Biology* 94, no. 1: 1-6.
- Kasai, Atsuko, Takaki Shima, and Masato Okada. 2005. Role of Src Family Tyrosine Kinases in the Down-Regulation of Epidermal Growth Factor Signaling in PC12 Cells. *Genes to Cells* 10, no. 12: 1175-1187.
- Kim, Y. M., W. Reed, A. G. Lenz, I. Jaspers, R. Silbajoris, H. S. Nick, and J. M. Samet. 2005. Ultrafine Carbon Particles Induce Interleukin-8 Gene Transcription and P38 MAPK Activation in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 288, no. 3: L432-L441.
- Kirkham, M. and R. G. Parton. 2005. Clathrin-Independent Endocytosis: New Insights into Caveolae and Non-Caveolar Lipid Raft Carriers. *Biochim.Biophys.Acta* 1745, no. 3: 273-286.
- Klein, U., G. Gimpl, and F. Fahrenholz. 1995. Alteration of the Myometrial Plasma Membrane Cholesterol Content With Beta-Cyclodextrin Modulates the Binding Affinity of the Oxytocin Receptor. *Biochemistry* 34, no. 42: 13784-13793.
- Kolesnick, R. N., F. M. Goni, and A. Alonso. 2000. Compartmentalization of Ceramide Signaling: Physical Foundations and Biological Effects. *J.Cell Physiol* 184, no. 3: 285-300.
- Kreyling, W. and G. Scheuch. 2000. "Clearance of Particles Deposited in the Lungs," in *Particle Lung Interactions*, ed. P. Gehr and J. Heyder, (New York: Michael Dekker), 323-376.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, no. 5259: 680-685.
- Lafrenie, R. M. and K. M. Yamada. 1996. Integrin-Dependent Signal Transduction. *J.Cell Biochem.* 61, no. 4: 543-553.
- Lahl, U. and Steven W. Feinstaub-eine gesundheitliche Herausforderung. 2005.
- Leevers, S. J., B. Vanhaesebroeck, and M. D. Waterfield. 1999. Signalling Through Phosphoinositide 3-Kinases: the Lipids Take Centre Stage. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, no. 2: 219-225.
- Lemmon, Mark A. and Joseph Schlessinger. 2010. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141, no. 7: 1117-1134.
- Li, N., T. Xia, and A. E. Nel. 2008. The Role of Oxidative Stress in Ambient Particulate Matter-Induced Lung Diseases and Its Implications in the Toxicity of Engineered Nanoparticles. *Free Radic.Biol.Med.* 44, no. 9: 1689-1699.
- Lingwood, D. and K. Simons. 2010. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* 327, no. 5961: 46-50.



- London, E. and D. A. Brown. 2000. Insolubility of Lipids in Triton X-100: Physical Origin and Relationship to Sphingolipid/Cholesterol Membrane Domains (Rafts). *Biochim.Biophys.Acta* 1508, no. 1-2: 182-195.
- Lowry, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. 1951. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, no. 1: 265-275.
- Loza-Coll, M. A., S. Perera, W. Shi, and J. Filmus. 2005. A Transient Increase in the Activity of Src-Family Kinases Induced by Cell Detachment Delays Anoikis of Intestinal Epithelial Cells. *Oncogene* 24, no. 10: 1727-1737.
- Luster, Michael I. and Petia P. Simeonova. 1998. Asbestos Induces Inflammatory Cytokines in the Lung Through Redox Sensitive Transcription Factors. *Toxicology Letters* 102-103: 271-275.
- Madshus, Inger Helene and Espen Stang. 2009. Internalization and Intracellular Sorting of the EGF Receptor: a Model for Understanding the Mechanisms of Receptor Trafficking. *Journal of Cell Science* 122, no. 19: 3433-3439.
- Mansat-de Mas, V., C. Bezombes, A. Quillet-Mary, A. Bettaieb, A. D. D'orgeix, G. Laurent, and J. P. Jaffrezou. 1999. Implication of Radical Oxygen Species in Ceramide Generation, C-Jun N-Terminal Kinase Activation and Apoptosis Induced by Daunorubicin. *Mol.Pharmacol.* 56, no. 5: 867-874.
- Marano, F., S. Hussain, F. Rodrigues-Lima, A. Baeza-Squiban, and S. Boland. 2010. Nanoparticles: Molecular Targets and Cell Signalling. *Arch.Toxicol.*
- Martens, J. R., R. Navarro-Polanco, E. A. Coppock, A. Nishiyama, L. Parshley, T. D. Grobaski, and M. M. Tamkun. 2000. Differential Targeting of Shaker-Like Potassium Channels to Lipid Rafts. *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 11: 7443-7446.
- Martin, S. F., H. Sawai, J. M. Villalba, and Y. A. Hannun. 2007. Redox Regulation of Neutral Sphingomyelinase-1 Activity in HEK293 Cells Through a GSH-Dependent Mechanism. *Arch.Biochem.Biophys.* 459, no. 2: 295-300.
- Megha and Erwin London. 2004. Ceramide Selectively Displaces Cholesterol From Ordered Lipid Domains (Rafts): IMPLICATIONS FOR LIPID RAFT STRUCTURE AND FUNCTION. *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 11: 9997-10004.
- Meister, Gunter and Thomas Tuschl. 2004. Mechanisms of Gene Silencing by Double-Stranded RNA. *Nature* 431, no. 7006: 343-349.
- Mineo, Chieko, Gordon N. Gill, and Richard G. W. Anderson. 1999. Regulated Migration of Epidermal Growth Factor Receptor From Caveolae. *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 43: 30636-30643.

- Monick, Martha M., Rama K. Mallampalli, Aaron B. Carter, Dawn M. Flaherty, Diann McCoy, Pamela K. Robeff, Michael W. Peterson, and Gary W. Hunninghake. 2001. Ceramide Regulates Lipopolysaccharide-Induced Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt Activity in Human Alveolar Macrophages. *The Journal of Immunology* 167, no. 10: 5977-5985.
- Monteiller, C., L. Tran, W. MacNee, S. Faux, A. Jones, B. Miller, and K. Donaldson. 2007. The Pro-Inflammatory Effects of Low-Toxicity Low-Solubility Particles, Nanoparticles and Fine Particles, on Epithelial Cells in Vitro: the Role of Surface Area. *Occup. Environ. Med.* 64, no. 9: 609-615.
- Moro, L., M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, G. Tarone, and P. Defilippi. 1998. Integrins Induce Activation of EGF Receptor: Role in MAP Kinase Induction and Adhesion-Dependent Cell Survival. *EMBO J.* 17, no. 22: 6622-6632.
- Moro, L., L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, Erba E. Boeri, M. Smeriglio, E. Turco, S. F. Retta, M. G. Giuffrida, M. Venturino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, E. Schaefer, L. Beguinot, C. Tacchetti, P. Gaggini, L. Silengo, G. Tarone, and P. Defilippi. 2002. Integrin-Induced Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Activation Requires C-Src and P130Cas and Leads to Phosphorylation of Specific EGF Receptor Tyrosines. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 11: 9405-9414.
- Nel, A., T. Xia, L. Madler, and N. Li. 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 311, no. 5761: 622-627.
- Oberdorster, G. 2001. Pulmonary Effects of Inhaled Ultrafine Particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, no. 1: 1-8.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster. 2005. Nanotoxicology: an Emerging Discipline Evolving From Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* 113, no. 7: 823-839.
- Ovrevik, Johan, Marit Lag, Per Schwarze, and Magne Refsnes. 2004. P38 and Src-ERK1/2 Pathways Regulate Crystalline Silica-Induced Chemokine Release in Pulmonary Epithelial Cells. *Toxicological Sciences* 81, no. 2: 480-490.
- Parsons, Sarah J. and J. Thomas Parsons. 0 AD. Src Family Kinases, Key Regulators of Signal Transduction. *Oncogene* 23, no. 48: 7906-7909.
- Parton, R. G. 1996. Caveolae and Caveolins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, no. 4: 542-548.
- Pike, L. J. 2003. Lipid Rafts: Bringing Order to Chaos. *Journal of Lipid Research* 44, no. 4: 655-667.
- Pike, L. J. 2005. Growth Factor Receptors, Lipid Rafts and Caveolae: an Evolving Story. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, no. 3: 260-273.
- Pike, L. J., X. Han, and R. W. Gross. 2005. Epidermal Growth Factor Receptors Are Localized to Lipid Rafts That Contain a Balance of Inner and Outer Leaflet Lipids: a Shotgun Lipidomics Study. *J Biol. Chem.* 280, no. 29: 26796-26804.

- Pitha, J., T. Irie, P. B. Sklar, and J. S. Nye. 1988. Drug Solubilizers to Aid Pharmacologists: Amorphous Cyclodextrin Derivatives. *Life Sci.* 43, no. 6: 493-502.
- Pope III, C. Arden, Richard T. Burnett, Michael J. Thun, Eugenia E. Calle, Daniel Krewski, Kazuhiko Ito, and George D. Thurston. 2002. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-Term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 287, no. 9: 1132-1141.
- Pope, C. A., III, D. V. Bates, and M. E. Raizenne. 1995. Health Effects of Particulate Air Pollution: Time for Reassessment? *Environ. Health Perspect.* 103, no. 5: 472-480.
- Pourazar, J., I. S. Mudway, J. M. Samet, R. Helleday, A. Blomberg, S. J. Wilson, A. J. Frew, F. J. Kelly, and T. Sandstrom. 2005. Diesel Exhaust Activates Redox-Sensitive Transcription Factors and Kinases in Human Airways. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 289, no. 5: L724-L730.
- Pralle, A., P. Keller, E. L. Florin, K. Simons, and J. K. Horber. 2000. Sphingolipid-Cholesterol Rafts Diffuse As Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology* 148, no. 5: 997-1008.
- Puri, Claudia, Daniela Tosoni, Riccardo Comai, Andrea Rabellino, Daniela Segat, Federico Caneva, Paola Luzzi, Pier Paolo Di Fiore, and Carlo Tacchetti. 2005. Relationships Between EGFR Signaling-Competent and Endocytosis-Competent Membrane Microdomains. *Molecular Biology of the Cell* 16, no. 6: 2704-2718.
- Rae, T. 1977. Tolerance of Mouse Macrophages in Vitro to Barium Sulfate Used in Orthopedic Bone Cement. *J.Biomed.Mater.Res.* 11, no. 6: 839-846.
- Ramseger, R., R. White, and S. Kroger. 2009. Transmembrane Form Agrin-Induced Process Formation Requires Lipid Rafts and the Activation of Fyn and MAPK. *Journal of Biological Chemistry* 284, no. 12: 7697-7705.
- Ramstedt, B. and J. P. Slotte. 2002. Membrane Properties of Sphingomyelins. *FEBS Lett.* 531, no. 1: 33-37.
- Rietveld, Anton and Kai Simons. 1998. The Differential Miscibility of Lipids As the Basis for the Formation of Functional Membrane Rafts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1376, no. 3: 467-479.
- Ringerike, T., F. D. Blystad, F. O. Levy, I. H. Madshus, and E. Stang. 2002. Cholesterol Is Important in Control of EGF Receptor Kinase Activity but EGF Receptors Are Not Concentrated in Caveolae. *J.Cell Sci.* 115, no. Pt 6: 1331-1340.
- Roduner, E. 2006. Size Matters: Why Nanomaterials Are Different. *Chem.Soc.Rev.* 35, no. 7: 583-592.

- Roepstorff, K., P. Thomsen, K. Sandvig, and B. van Deurs. 2002. Sequestration of Epidermal Growth Factor Receptors in Non-Caveolar Lipid Rafts Inhibits Ligand Binding. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 21: 18954-18960.
- Roskoski, R., Jr. 2004. Src Protein-Tyrosine Kinase Structure and Regulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 324, no. 4: 1155-1164.
- Rucci, N., M. Susa, and A. Teti. 2008. Inhibition of Protein Kinase C-Src As a Therapeutic Approach for Cancer and Bone Metastases. *Anticancer Agents Med.Chem.* 8, no. 3: 342-349.
- Sargiacomo, M., M. Sudol, Z. Tang, and M. P. Lisanti. 1993. Signal Transducing Molecules and Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked Proteins Form a Caveolin-Rich Insoluble Complex in MDCK Cells. *The Journal of Cell Biology* 122, no. 4: 789-807.
- Scapoli, Luca, Maria E. Ramos-Nino, Marcella Martinelli, and Brooke T. Mossman. 0 AD. Src-Dependent ERK5 and Src//EGFR-Dependent ERK1//2 Activation Is Required for Cell Proliferation by Asbestos. *Oncogene* 23, no. 3: 805-813.
- Severin, S., C. Ghevaert, and A. Mazharian. 2010. The Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways: Role in Megakaryocyte Differentiation. *J.Thromb.Haemost.* 8, no. 1: 17-26.
- Sheets, E. D., D. Holowka, and B. Baird. 1999. Critical Role for Cholesterol in Lyn-Mediated Tyrosine Phosphorylation of FcepsilonRI and Their Association With Detergent-Resistant Membranes. *The Journal of Cell Biology* 145, no. 4: 877-887.
- Shenoy-Scaria, A. M., D. J. Dietzen, J. Kwong, D. C. Link, and D. M. Lublin. 1994. Cysteine3 of Src Family Protein Tyrosine Kinase Determines Palmitoylation and Localization in Caveolae. *The Journal of Cell Biology* 126, no. 2: 353-363.
- Shogomori, H. and D. A. Brown. 2003. Use of Detergents to Study Membrane Rafts: the Good, the Bad, and the Ugly. *Biol.Chem.* 384, no. 9: 1259-1263.
- Sies, H. 1999. Glutathione and Its Role in Cellular Functions. *Free Radic.Biol.Med.* 27, no. 9-10: 916-921.
- Simons, K. and G. van Meer. 1988. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry* 27, no. 17: 6197-6202.
- Simons, K. and E. Ikonen. 1997. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* 387, no. 6633: 569-572.
- Simons, K. and D. Toomre. 2000. Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, no. 1: 31-39.
- Singer, S. J. and Garth L. Nicolson. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, no. 4023: 720-731.

- Song, K. S., M. Sargiacomo, F. Galbiati, M. Parenti, and M. P. Lisanti. 1997. Targeting of a G Alpha Subunit (Gi1 Alpha) and C-Src Tyrosine Kinase to Caveolae Membranes: Clarifying the Role of N-Myristoylation. *Cell Mol.Biol. (Noisy.-le-grand)* 43, no. 3: 293-303.
- Stauffer, Thomas P. and Tobias Meyer. 1997. Compartmentalized IgE Receptor Mediated Signal Transduction in Living Cells. *The Journal of Cell Biology* 139, no. 6: 1447-1454.
- Stier, A. and E. Sackmann. 1973. Spin Labels As Enzyme Substrates Heterogeneous Lipid Distribution in Liver Microsomal Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 311, no. 3: 400-408.
- Stone, V., J. Shaw, D. M. Brown, W. MacNee, S. P. Faux, and K. Donaldson. 1998. The Role of Oxidative Stress in the Prolonged Inhibitory Effect of Ultrafine Carbon Black on Epithelial Cell Function. *Toxicol.In Vitro* 12, no. 6: 649-659.
- Sydlik, U., I. Gallitz, C. Albrecht, J. Abel, J. Krutmann, and K. Unfried. 2009. The Compatible Solute Ectoine Protects Against Nanoparticle-Induced Neutrophilic Lung Inflammation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 180, no. 1: 29-35.
- Sydlik, Ulrich, Katrin Bierhals, Maria Soufi, Josef Abel, Roel P. F. Schins, and Klaus Unfried. 2006. Ultrafine Carbon Particles Induce Apoptosis and Proliferation in Rat Lung Epithelial Cells Via Specific Signaling Pathways Both Using EGF-R. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* 291, no. 4: L725-L733.
- Tamaoki, J., K. Isono, K. Takeyama, E. Tagaya, J. Nakata, and A. Nagai. 2004. Ultrafine Carbon Black Particles Stimulate Proliferation of Human Airway Epithelium Via EGF Receptor-Mediated Signaling Pathway. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 287, no. 6: L1127-L1133.
- Thomas Tuschl. 2001. RNA Interference and Small Interfering RNAs. *ChemBioChem* 2: 239-245.
- Thomas, S. M. and J. S. Brugge. 1997. Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 13: 513-609.
- Timasheff, S. N. 1992. Water As Ligand: Preferential Binding and Exclusion of Denaturants in Protein Unfolding. *Biochemistry* 31, no. 41: 9857-9864.
- Troussard, A. A., N. M. Mawji, C. Ong, A. Mui, R. Arnaud, and S. Dedhar. 2003. Conditional Knock-Out of Integrin-Linked Kinase Demonstrates an Essential Role in Protein Kinase B/Akt Activation. *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 25: 22374-22378.
- Umweltbundesamt (UBA). Hintergrundblätter zum Thema Staub/Feinstaub (PM). 2005.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L. O., von Mikecz, A., Grether-Beck, S., and Schins, R. P. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* 1, 52-74. 2007.

- Unfried, K., U. Sydlik, K. Bierhals, A. Weissenberg, and J. Abel. 2008. Carbon Nanoparticle-Induced Lung Epithelial Cell Proliferation Is Mediated by Receptor-Dependent Akt Activation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 294, no. 2: L358-L367.
- Valavanidis, A., K. Fiotakis, and T. Vlachogianni. 2008. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *J.Environ.Sci.Health C.Environ.Carcinog.Ecotoxicol.Rev.* 26, no. 4: 339-362.
- van der, Flier A. and A. Sonnenberg. 2001. Function and Interactions of Integrins. *Cell Tissue Res.* 305, no. 3: 285-298.
- van Heyningen, W. E., S. van Heyningen, and C. A. King. 1976. The Nature and Action of Cholera Toxin. *Ciba Found.Symp.*, no. 42: 73-88.
- van Meer, G. and K. Simons. 1988. Lipid Polarity and Sorting in Epithelial Cells. *J.Cell Biochem.* 36, no. 1: 51-58.
- Vereb, G., J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2003. Dynamic, Yet Structured: The Cell Membrane Three Decades After the Singer-Nicolson Model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, no. 14: 8053-8058.
- Waugh, M. G., D. Lawson, and J. J. Hsuan. 1999. Epidermal Growth Factor Receptor Activation Is Localized Within Low-Buoyant Density, Non-Caveolar Membrane Domains. *Biochemical Journal* 337, no. 3: 591-597.
- Weissenberg, A., U. Sydlik, H. Peuschel, P. Schroeder, M. Schneider, R. P. Schins, J. Abel, and K. Unfried. 2010. Reactive Oxygen Species As Mediators of Membrane-Dependent Signaling Induced by Ultrafine Particles. *Free Radic.Biol.Med.* 49, no. 4: 597-605.
- Whitfield, J. The need for fat. *Nature* . 2004.
- Wilson, M. R., J. H. Lightbody, K. Donaldson, J. Sales, and V. Stone. 2002. Interactions Between Ultrafine Particles and Transition Metals in Vivo and in Vitro. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 184, no. 3: 172-179.
- Woodgett, J. R. 2005. Recent Advances in the Protein Kinase B Signaling Pathway. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17, no. 2: 150-157.
- Yamaji-Hasegawa, A. and M. Tsujimoto. 2006. Asymmetric Distribution of Phospholipids in Biomembranes. *Biol.Pharm.Bull.* 29, no. 8: 1547-1553.
- Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, and G. N. Somero. 1982. Living With Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science* 217, no. 4566: 1214-1222.

- Yancey, P. H. 2005. Organic Osmolytes As Compatible, Metabolic and Counteracting Cytoprotectants in High Osmolarity and Other Stresses. *J.Exp.Biol.* 208, no. Pt 15: 2819-2830.
- Zajchowski, L. D. and S. M. Robbins. 2002. Lipid Rafts and Little Caves. Compartmentalized Signalling in Membrane Microdomains. *Eur.J.Biochem.* 269, no. 3: 737-752.
- Zhang, Qin, Steven R. Kleeberger, and Sekhar P. Reddy. 2004. DEP-Induced Fra-1 Expression Correlates With a Distinct Activation of AP-1-Dependent Gene Transcription in the Lung. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* 286, no. 2: L427-L436.
- Zhang, Y., X. Li, K. A. Becker, and E. Gulbins. 2009. Ceramide-Enriched Membrane Domains--Structure and Function. *Biochim.Biophys.Acta* 1788, no. 1: 178-183.
- Zhao, H., X. Cao, G. Wu, H. H. Loh, and P. Y. Law. 2009. Neurite Outgrowth Is Dependent on the Association of C-Src and Lipid Rafts. *Neurochem.Res.*
- Zöfel, P. 1992. *Statistik in Der Praxis*, 3.überarbeitete Auflage, Jena: Fischer Verlag.

## Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei meinem Betreuer und AG-Leiter Dr. Klaus Unfried für die Überlassung des interessanten Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine hilfreichen Ideen und Ratschläge bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Proksch für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Mein Dank gilt außerdem dem GK 1427, dem ich als Stipendiatin angehörte, für die vielen lehrreichen Veranstaltungen und die Förderung meiner toxikologischen Weiterbildung

Zudem möchte ich mich bei allen Kollegen der AG Molekulare Toxikologie für das nette Arbeitsklima während meiner Zeit am IUF bedanken. Mein Dank gilt besonders Ulli, Inka, Alex, Daniel und Matthias für die kollegiale Zusammenarbeit, zahlreiche wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Gespräche bei Kuchen und Tee sowie deren Toleranz gegenüber meinen ABBA-Songs;). Danke an Ulli, der immer ein offenes Ohr und gute Ideen hatte, wenn es mal wieder nicht so richtig weiterging! Des Weiteren möchte ich mich bei Ragnhild und Herrn Brock für die exzellente technische Assistenz bedanken, für das Ansetzen zahlreicher Lösungen und Puffer sowie fürs morgendliche Vorinkubieren, während ich noch im Bett lag! Der große Durchbruch war immer ganz nah!

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der gesamten AG Zellbiologie am IUF, besonders bei Dr. Grether-Beck, Zippora und Ingo für die Lipidmessungen und die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit. Danke auch an Dr. Händler für die Zusammenarbeit in Sachen siRNA.

Mein besonderer Dank gilt Kirsten, für die vielen netten Gespräche, Shopping-Touren zum Stress-Abbau, Kino- und Cocktail-Abende, fürs Korrekturlesen und die DNA-Spende;) Herzlicher Dank gilt auch meinen Freunden in Düsseldorf & Hannover, vor allem Christiane und Sönke für die moralische Unterstützung, Telefonseelsorge, fürs Korrekturlesen und die Motivation & Aufbauarbeit, wenn der Durchbruch mal wieder auf sich warten ließ!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern und Brüdern, dafür bedanken, dass sie immer für mich da sind, an mich glauben und mich immer unterstützt haben.



## Lebenslauf

Name Henrike Peuschel  
Staatsangehörigkeit Deutsch

---

### Ausbildung

1994-2000 Gymnasium Dömitz  
Abschluss Abitur

2000-2006 Universität Hannover, Studium der Biologie  
Studienschwerpunkte: Genetik, Biochemie,  
Pharmakologie/Toxikologie

08/2005-04/2006 Diplomarbeit, Thema: „*Transportverhalten  
hochglykosylierter Membranproteine in  
glykosylierungsdefekten CHO-Lec Zellen*“  
Abschluss mit „sehr gut“

01/2007-01/2010 Stipendiatin im Graduiertenkolleg GK1427 der Universität  
Düsseldorf

seit 01/2007 Doktorarbeit am Institut für Umweltmedizinische  
Forschung (IUF), AG Molekulare Toxikologie  
Thema: „*Die Rolle von Membranstrukturen bei der durch  
ultrafeine Partikel induzierten Proliferation in  
Lungenepithelzellen*“  
Betreuer: PD Dr. Klaus Unfried

---

### Fortbildung

Kurs in Versuchstierkunde, Kategorie B-FELASA  
(Federation of European Laboratory Animal Science  
Associations)  
Fortbildungslehrgang nach §15 Abs.2 Satz 1 Nr.3  
GenTSV „Gentechnische Sicherheit“  
Kurse zur Weiterbildung zum Fachtoxikologen:  
Occupational Toxicology  
Reproductive Toxicology  
Grundlagen der Organtoxikologie und Pathologie  
Klinische Toxikologie  
Fremdstoffmetabolismus/Toxikokinetik  
Lebensmitteltoxikologie

---

### Berufliche Tätigkeit

seit 01/2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin IUF, Düsseldorf, AG  
Molekulare Toxikologie

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

(Henrike Peuschel)

Düsseldorf, den 15. September 2010

---