

**Analyse der molekularen Mechanismen
pathogener Effekte von ultrafeinen Partikeln:
Induktion von Apoptose und Proliferation**

Inaugural-Dissertation

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

Angefertigt am Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH (IUF)

vorgelegt von
Ulrich Sydlik
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2006

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

Referent: Prof. Dr. Josef Abel

Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	3
1.1 Toxikologie von Partikeln	3
1.2 Proliferation und Zellzyklus-Kontrolle	9
1.3 Apoptose	13
1.4 Ziel der Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Chemikalien	18
2.1.1 Partikel	18
2.2 Zellkultur	19
2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen	19
2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	19
2.2.3 Belastung der Zellen	20
2.3 Zytotoxizitätsassay	21
2.4 Proliferationsassay	22
2.5 Apoptoseassays	23
2.5.1 TUNEL („transferase-mediated dUTP nick end labeling“)	23
2.5.2 Caspase-3-Aktivitätsassay	24
2.6 Bestimmung von Glutathion und Glutathiondisulfid	24
2.7 Gelelektrophorese und Western-Blot	26
2.7.1 Herstellung von Proteinextrakten	26
2.7.2 Isolierung zytoplasmatischer Proteine	26
2.7.3 Proteinbestimmung	27
2.7.4 Immunpräzipitation	27
2.7.5 Proteingelelektrophorese	28
2.7.6 Western-Blot	28
2.7.7 Immunologischer Proteinnachweis	29
2.7.8 Quantifizierung	30
2.7.9 Entfernen der Antikörper von Membranen	31
2.8 Statistik	31

3	ERGEBNISSE	32
3.1	Partikel-induzierte Apoptose	32
3.2	Partikel-induzierte Proliferation	37
3.3	Ist die Partikel-induzierte Proliferation eine Kompensation der Apoptose?	41
3.4	Beteiligung von Zelloberflächen-Rezeptoren	43
3.4.1	„Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGF-R)	43
3.4.2	Beteiligung von β_1 -Integrin	46
3.5	Signalwege in der Zelle	47
3.6	Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) als Mediatoren der Partikel-spezifischen Signaltransduktion	50
3.6.1	Einfluss von Partikeln auf den Oxidations-/Antioxidationsstatus der Zelle	51
3.6.2	Einfluss von ROS auf die Apoptose bzw. die Proliferation	52
3.6.3	MAP-Kinase-Signalwege	54
3.6.4	Die Rolle von Kalzium als Mediator der ufCB-induzierten Apoptose	55
3.7	Über welche Signalwege wird die Partikel-induzierte Apoptose vermittelt?	57
4	DISKUSSION	61
4.1	Partikel-induzierte Apoptose und Proliferation	62
4.2	Die Partikel-induzierte Proliferation, ein Feedbackmechanismus der Apoptose?	63
4.3	Rolle des EGF-Rezeptors und der Integrinrezeptoren bei der ufP-induzierten Apoptose und Proliferation	65
4.4	Partikel-induzierte Signalwege, die Apoptose und Proliferation regulieren	67
4.5	ROS als initiales Ereignis für Apoptose und Proliferation	68
4.6	Mechanismus der Partikel-induzierten Apoptose	70
4.7	Die Einordnung dieser Arbeit	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	LITERATUR	73
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	89

1 EINLEITUNG

Die gesundheitsschädliche Wirkung von Feinstaub hat in den letzten Jahren erhebliche Bedeutung in den Medien und in der öffentlichen Wahrnehmung erlangt. Die Messungen der Feinstaubkonzentration („Particulate Matter“, PM) an verschiedenen innerstädtischen Messstationen in Düsseldorf (z.B. Corneliusstraße, Ludenberger Straße) und anderen Großstädten in Deutschland haben Überschreitungen der von der Europäischen Union zugelassenen Höchstgrenze für die Partikelmasse in der Atmosphäre ergeben. Nach dieser, im April 1999 verabschiedeten Richtlinie (99/30/EG) sind seit dem 1. Januar 2005 pro Jahr nur noch maximal 35 Überschreitungen des PM₁₀-Tagesmittelwertes von 50 µg/m³ zulässig. Der zulässige Jahresmittelwert für PM₁₀ (Partikel ≤ 10 µm) liegt bei 40 µg/m³. Die Notwendigkeit solcher Richtlinien wird in den folgenden Kapiteln detailliert erläutert.

1.1 Toxikologie von Partikeln

Sämtliche in der Luft verteilte Feststoffe werden, unabhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung und Größe, als PM zusammengefasst. Partikel können dabei aus natürlichen und aus anthropogenen Quellen hervorgehen. Zu den natürlichen Partikelquellen zählen Wald- und Buschbrände, Vulkanausbrüche, Bodenerosion und auch organische Materialien wie Pollen, Sporen oder Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze). Anthropogen erzeugte Partikel entstehen unter anderem bei Verbrennungsprozessen (Industrie, Heizöfen), im Verkehr (Flugzeugturbinen, Motorenabgase [insbesondere von Dieselmotoren], Reifenabrieb), in Wohnungen (Kochen, Grillen) und beim Zigarettenrauchen (Oberdörster *et al.*, 2005).

Die Lunge des Menschen steht mit einer Fläche von 140 m² direkt mit der Umwelt in Kontakt und ist deshalb ein empfindliches Ziel für die beschriebenen Verunreinigungen (Hoet *et al.*, 2004). Bereits seit den 50er Jahren ist bekannt, dass die Exposition mit Partikeln zur Entstehung verschiedener Erkrankungen der Lunge und des Herz-Kreislauf-Systems beiträgt. Verschiedene Beispiele aus der Arbeitsmedizin belegen den Zusammenhang zwischen der Partikelexposition am

Arbeitsplatz und dem Auftreten spezieller Erkrankungen der Lunge (Pope, 1989; Dockery & Pope, 1994; Pope *et al.*, 1995). Partikel-induzierte Lungenerkrankungen (Pneumokoniosen) sind durch eine Fibrosierung des Lungenparenchymgewebes gekennzeichnet und können durch verschiedene Partikeltypen wie Asbest (Asbestose; Craighead & Mossman, 1982; Mossman & Churg, 1998), Quarz (Silikose; Landrigan, 1987; Castranova & Vallyathan, 2000) oder Grubenstaub (Bergmannslunge, Lapp & Castranova, 1993) verursacht werden. Lungenfibrosen kommen besonders oft bei Bergleuten und Minenarbeitern vor, und werden häufig von einer erhöhten Lungentumorinzidenz begleitet. Aber auch Berufsgruppen, die den Fahrzeugabgasen im Straßenverkehr ausgesetzt werden, sind gefährdet. So wurde bei Busfahrern und Lokomotivführern ein Zusammenhang zwischen der Belastung mit Dieselpartikeln („Diesel Exhaust Particles“, DEP) und der Schädigung der DNS festgestellt (Loft *et al.*, 1999).

Zusätzlich zu den beschriebenen Arbeitsplatz-bedingten Erkrankungen gibt es auch Krankheiten, die durch natürliche Luftverunreinigungen ausgelöst werden. So weisen viele epidemiologische Studien auf einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Partikelbelastung der Luft und dem Auftreten verschiedener Erkrankungen wie Allergien, Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), Schlaganfall sowie Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems hin (Wichmann & Heinrich, 1995; Pope, 2000; Penttinen *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2001; Pope *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Mortalitätsrate durch eine Zunahme der Feinstaubkonzentration um $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft um bis zu 8% erhöht sein kann (Samet *et al.*, 2000; Pope *et al.*, 2002).

Neben der Lunge können Partikel theoretisch auch in andere Bereiche des Körpers eindringen und diese schädigen. In tierexperimentellen Studien wurde nachgewiesen, dass ultrafeine Partikel auch in die Blutbahn (Berry *et al.*, 1977), die Leber (Oberdörster *et al.*, 2002), die Haut (Tinkle *et al.*, 2003) oder das Gehirn (Oberdörster *et al.*, 2005) eintreten können.

Um eine einheitliche Klassifizierung der Partikel zu ermöglichen, führte die amerikanische Umweltschutzbehörde EPA (Environmental Protection Agency) 1987 den „National Air Quality Standard for Particulate Matter“ ein. Danach werden Partikel anhand ihres Durchmessers in ultrafeine Partikel (ufP) und in feine Partikel aufgeteilt (Abb. 1). Als ufP werden alle Partikel bezeichnet, die kleiner als 100 nm sind. Feine Partikel werden nochmals in $\text{PM}_{2.5}$ und PM_{10} unterschieden. $\text{PM}_{2.5}$

umfasst alle Partikel kleiner als 2,5 µm. Partikel, die kleiner als 10 µm sind, werden als PM₁₀ bezeichnet, d.h. PM₁₀ umfasst auch die Gruppe der ufP und PM_{2.5}.

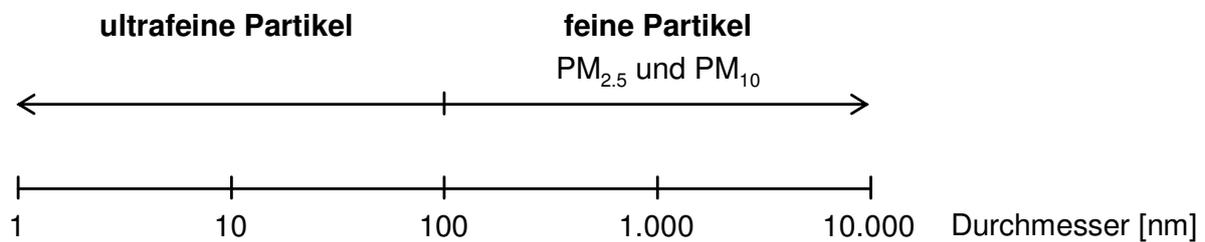


Abbildung 1: Partikel-Größen-Skala (verändert nach Donaldson *et al.*, 2001a)

Relative Größe der ultrafeinen Partikel im Vergleich zu PM_{2.5} und PM₁₀

Zusätzlich zu den beschriebenen ultrafeinen Umweltpartikeln werden Partikel mit einem Durchmesser kleiner 100 nm auch zu industriellen Zwecken hergestellt. Diese als Nanopartikel (NP) bezeichneten ufP finden bei einer Vielzahl von Branchen bei der Herstellung unterschiedlicher Produkte Anwendung. NP werden unter anderem für die Herstellung chemischer Katalysatoren, elektronischer Speichermedien, feuerhemmender und keramischer Werkstoffe sowie Farben und Kosmetika (z.B. als UV-Schutz in Sonnencremes) verwendet. Aufgrund ihrer großen spezifischen Oberfläche sind sie in der Lage, Proteine und andere Substanzen zu adsorbieren, und können deshalb auch in der Arzneimittelapplikation (Kreuter, 2001) und der Diagnostik von Tumorerkrankungen (Matsumara & Maeda, 1986) hilfreich sein. Auch Fullerene, wenige Nanometer große, ausschließlich aus Kohlenstoffatomen bestehende fußballförmige Makromoleküle können als Vehikel zum Transport von Arzneimitteln genutzt werden. Fullerene sind in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen, und werden dann bevorzugt in den Mitochondrien angereichert (Foley *et al.*, 2002). Die gleichen Eigenschaften, die NP so attraktiv für die Medizin machen, können für die Zellen jedoch auch schädlich sein. So könnte z.B. die Applikation eines an Partikel gebundenen Medikaments zu einer erhöhten Toxizität führen, da die Dosis am Ort der Wirkung zu hoch wäre (Oberdörster *et al.*, 2005).

Neben der Größe sind auch die Oberflächenstruktur und die Oberflächenladung zwei wichtige Partikelcharakteristika (Lee *et al.*, 1986). Die Hydrophilie der Partikeloberfläche ist von entscheidender Bedeutung, da sie bei der Adsorption

verschiedener Substanzen eine wichtige Rolle besitzt (van Oss, 1994). Partikel sind in der Lage, Transitionsmetalle wie Eisen, Mangan oder Kupfer (Costa & Dreher, 1997; Wilson *et al.*, 2002; Donaldson, 2006) und verschiedene organo-chemische Verbindungen auf ihrer Oberfläche zu binden. Diese Gruppe umfasst neben den polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH's; z.B. Benz[a]pyren, Benz[a]anthracen) sowie deren Nitro-Derivate (z.B. Chinone oder Ketone) auch heterozyklische organische Verbindungen und aliphatische Kohlenwasserstoffe (Finlayson-Pitts & Pitts, 1997; Li *et al.*, 2003; Oberdörster *et al.*, 2005; Nel *et al.*, 2006). Diese „Beschichtung“ der Oberfläche erhöht die Partikelreaktivität (Spurny, 1998; Oberdörster, 2001).

Inhalierbare Partikel stellen ein hohes Risiko für den Organismus dar. Die Stärke der Partikel-induzierten Effekte hängt dabei entscheidend von der Größe, der spezifischen Oberfläche und der chemischen Reaktivität der Partikel ab (Oberdörster *et al.*, 2005). Außerdem ist die Wirkung der Partikel abhängig von der Dosis, der Ablagerung (Deposition) im Organismus, der Dimension, der Beständigkeit und den Abwehrreaktionen bzw. den Mechanismen zur Partikelbeseitigung (Bair *et al.*, 1994). Dabei wird die potentielle Toxizität der Partikel durch die Dosis an einem bestimmten Ort beschrieben, die wiederum durch die Partikelkonzentration und die Partikelgröße charakterisiert ist. Partikelanzahl und Partikeloberfläche nehmen bei gleicher Massendosis mit abnehmendem Durchmesser zu. Speziell die ultrafeine Partikelfraktion mit einer großen spezifischen Oberfläche löst adverse Gesundheitseffekte aus (Donaldson & Stone, 2003; Donaldson *et al.*, 2005). So erzeugt eine chronische Belastung mit ufP mehr Lungentumoren in Ratten als die entsprechende Dosis feiner Partikel (Driscoll, 1996; Greim *et al.*, 2001).

Auch die Partikelablagerung in der Lunge ist abhängig von der Partikelgröße. Inhalierbare Partikel können in den verschiedenen Abschnitten des Respirationstraktes deponiert werden. Je kleiner die Partikel sind, umso tiefer können sie in die Lunge penetrieren. Grobe Partikel lagern sich bereits im nasopharyngealen Bereich (obere Atemwege), d.h. in der Nase oder dem Kehlkopf ab. Ein Großteil der feinen Partikel wird bereits im tracheobronchialen Bereich (mittlere Atemwege), der aus Trachea, Bronchien und Bronchiolen aufgebaut ist, gefiltert. Etwa 20% der feinen Partikelfraktion dringen jedoch bis in den alveolaren Bereich (tiefe Atemwege, bestehend aus den respiratorischen Bronchiolen, den Alveolargängen und den von Blutkapillaren umgebenen Alveolen) vor, in denen sich auch die ufP ablagern

(Heyder *et al.*, 1986; International Commission on Radiological Protection, 1994). Aufgrund ihres größeren Durchmessers besitzen Partikelaggregate ein anderes Depositionsverhalten im Vergleich zum Einzelpartikel. Außerdem können die Charakteristika der Aggregate in Abhängigkeit von ihrer Festigkeit variieren. So können die Aggregate einerseits in der vom Lungenepithel sezernierten Flüssigkeit dispergiert werden. Die Lunge wird dann mit einzelnen Partikeln konfrontiert. Andererseits können sie in Form von Aggregaten fortbestehen, so dass die Lunge mit langen Ketten oder größeren Partikel-Einheiten exponiert wird (Donaldson *et al.*, 2001a; Donaldson *et al.*, 2001b).

Partikel verweilen in Abhängigkeit von den physikalischen und chemischen Eigenschaften unterschiedlich lange in der Lunge. Ist ein Partikeltyp unlöslich oder in der Lunge nicht abbaubar, folgt daraus eine hohe Beständigkeit, und es kommt zu einer raschen, lokalen Anreicherung bei fortdauernder Belastung. Die Persistenz der Partikel in der Lunge ist folglich mitentscheidend für ihre Toxizität (Warheit *et al.*, 1996; Warheit *et al.*, 1997). Die Lunge verfügt über umfangreiche Abwehrsysteme, um die Partikel zu entfernen. Partikel, die im Mucus der oberen und mittleren Atemwege deponiert wurden, werden durch rhythmische Bewegung der Zilien des Respirationsepithels mundwärts befördert und verschluckt. Im alveolaren Bereich werden die Partikel von Makrophagen phagozytiert. Die Reinigung der Lunge hängt dabei nicht nur von der Partikelgesamtmasse, sondern erneut auch von der Größe und der Oberfläche der einzelnen Partikel ab (Hoet *et al.*, 2004). UfP werden nur langsam oder gar nicht aus der Lunge entfernt, weil ihre geringe Größe ein Erkennen durch die alveolaren Makrophagen erschwert (Moghimi & Hunter, 2001; MacNee & Donaldson, 2003). Auch Asbestfasern, die länger als 20 µm sind, werden von den Makrophagen nicht aufgenommen. Die verminderte Phagozytose führt zu einer gesteigerten Interaktion der Partikel mit den Epithelzellen der Lunge (Donaldson *et al.*, 2001a; Hoet *et al.*, 2004).

Unlösliche ufP liefern mit ihrer großen Oberfläche eine Plattform, auf der freie Radikale durch Redox-Cycling der zuvor genannten Übergangsmetalle via Fenton-Reaktion generiert werden können. Auch die auf der Partikeloberfläche gebundenen PAH's und Chinone sind in der Lage, oxidativen Stress zu induzieren (Marano *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Donaldson *et al.*, 2005; Nel *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind ufP, die sowohl als Einzelpartikel aber auch als Aggregate vorliegen (Donaldson & Stone, 2003), imstande, aufgrund ihrer großen Oberfläche mit biologischen

Molekülen wie der DNS oder Proteinen zu interagieren (Kreyling *et al.*, 2006). Außerdem können Zellen wie Makrophagen, Epithelzellen oder neutrophile Granulozyten, die mit den Partikeln in Kontakt kommen, aktiviert werden und ROS freisetzen. Dieser oxidative Stress führt häufig zu Entzündungsreaktionen und zur erhöhten Freisetzung von Zytokinen (Nel *et al.*, 2001). In diesem Kontext ist auch der Signalweg des redox-sensitiven nuklearen Transkriptionsfaktors Kappa B (NFκB) untersucht worden, der durch verschiedene Partikeltypen aktiviert wird und zur Expression NFκB-induzierter Gene wie Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Interferon-γ (IFN-γ) und Transformierender-Wachstums-Faktor-β (TGF-β) führt (Shukla *et al.*, 2000; Donaldson & Stone, 2003; Castranova, 2004). Die Zytokin-abhängige Entzündung kann sich in Krankheiten wie Asthma, Emphysem oder Fibrose manifestieren. Außerdem aktiviert NFκB, wie auch der Partikel-induzierte oxidative Stress, Signalwege, die in die Regulation von Zell-Zyklus und Apoptose eingreifen (Chen *et al.*, 2002; Timblin *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2003).

In zahlreichen epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass besonders ufP schwere Gesundheitsschäden und ein Ansteigen der Sterblichkeitsrate infolge von Lungenfibrose und Lungenkrebs verursachen (Ferin *et al.*, 1992; Oberdörster *et al.*, 1994; Donaldson & MacNee, 2001). Alveolare Typ II Pneumozyten sind als Progenitor-Zellen bei der Entstehung von Lungentumoren beschrieben (BeruBe *et al.*, 1996). Der Tumorpromotion liegt dabei häufig ein Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation, zugunsten der Proliferation, zu Grunde (Manning & Patierno, 1996; Evan & Vousden, 2001; Fadeel & Orrenius, 2005). Proliferation und Apoptose beeinflussen die Zellzahl in entgegengesetzter Richtung. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose kann nur dann aufrechterhalten werden, wenn die durch äußere und innere Faktoren induzierten Signalwege genau aufeinander abgestimmt sind.

Die Proliferation von Lungengewebe konnte nach der Belastung mit Partikeln in vielen *in vivo*-Studien gezeigt werden. Ratten, die mit Asbestfasern instilliert wurden, entwickelten Lungenfibrosen, die durch eine Faser-induzierte Fibroblasten-Proliferation gekennzeichnet waren (BeruBe *et al.*, 1996; Robledo *et al.*, 2000; Faux *et al.*, 2001). Außerdem konnte die Induktion der Proliferation in der Lunge durch Quarz (Mossman & Churg, 1998; Albrecht *et al.*, 2001), DEP (Friemann *et al.*, 1999; Nikula, 2000) und auch mit den in vielen Studien als Inertstaub verwendeten Titandioxid-Partikeln (TiO₂; Bermudez *et al.*, 2003) beobachtet werden. In *in vitro*-

Studien mit Asbest (Buder-Hoffmann *et al.*, 2001) bzw. mit PM_{2.5} (Timblin *et al.*, 2002) belasteten C10-Zellen (Maus-Lungenepithelzellen) konnte zusätzlich zur Proliferation auch eine zu einem früheren Zeitpunkt einsetzende, Partikel-induzierte Apoptose beobachtet werden. Epithel-Gewebe reagieren auf eine Schädigung häufig mit einer kompensatorischen Proliferation (Sakamaki *et al.*, 2002). Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob auch die Partikel-induzierte Proliferation nur eine Kompensation der Apoptose darstellt, oder ob es sich um zwei voneinander unabhängige Prozesse handelt.

1.2 Proliferation und Zellzyklus-Kontrolle

Die Zellteilung ist ein biologischer Prozess, der das Wachstum und die Fortpflanzung aller Organismen gewährleistet. Die zwischen zwei Teilungen liegende Periode wird als Zellzyklus bezeichnet. Er besteht aus den vier Phasen G₁ (Wachstum der Zelle), S (Verdopplung der DNS), G₂ (Vorbereitung auf die Mitose) und Mitose (Teilung der Chromosomen, des Zellkerns und der Zelle) und läuft in allen eukaryotischen Zellen nahezu gleich ab (Abb. 2).

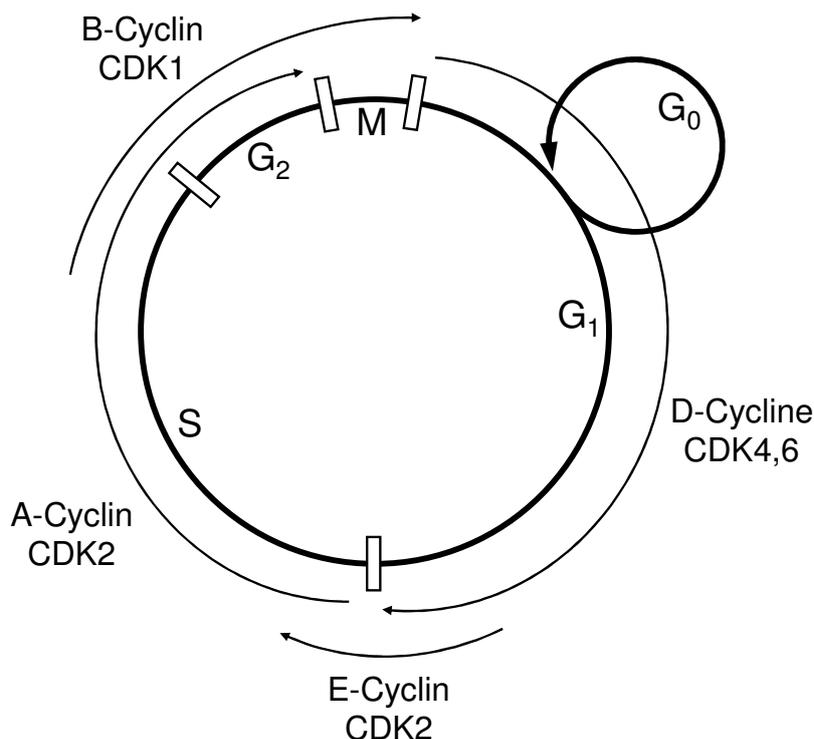


Abbildung 2: Aktivität von Cyclinen und CDK's im Verlauf des Zellzyklus
 G₁ = Gap-Phase 1, S = Synthese, G₂ = Gap-Phase 2, M = Mitose, G₀ = Ruhephase

Anstatt einen weiteren Zyklus zu durchlaufen, kann die Zelle nach vollendeter Mitose auch in die G_0 -Phase übergehen, in der sie im Ruhezustand verweilt. Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) reguliert (Morgan, 1997; Obaya & Sedivy, 2002). Die katalytische Einheit der CDK's ist nur dann aktiv, wenn sie mit der regulatorischen Untereinheit, den Cyclinen, assoziiert ist. Jede Phase des Zellzyklus ist durch die Expression eines speziellen Cyclinmusters charakterisiert, deren oszillierende Konzentrationen die CDK's regulieren (Abb. 2). Zusätzlich werden die CDK's durch die Phosphorylierung an Threoninresten und über Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (CKI) reguliert.

Während des Zellzyklus werden verschiedene Kontrollpunkte durchlaufen, an denen überprüft wird, ob eine Zellzyklus-Phase korrekt abgeschlossen ist. Der wichtigste Kontrollpunkt ist der so genannte Restriktionspunkt am Ende der G_1 -Phase, der z.B. durch DNS-Schädigung aktiviert wird (Sherr, 1996; Morgan, 1997; Obaya & Sedivy, 2002). In Folge dessen wird der Zellzyklus an dieser Stelle solange arretiert, bis das Signal wieder entfällt. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass nur unbeschädigte DNS repliziert wird.

CDK's, Cycline und CKI sind wesentliche Vermittler zwischen extrazellulären Signalen in der G_1 -Phase des Zellzyklus und dem Phosphorylierungszustand des Retinoblastom-Proteins (RB). Der RB-Phosphorylierungsstatus entscheidet darüber, ob eine Zelle proliferiert, differenziert oder in die Apoptose übergeht (Hinds *et al.*, 1992; Weinberg, 1995; Bartek *et al.*, 1997). Die nichtphosphorylierte Form des RB verhindert die Überschreitung des Restriktionspunktes (Arrest, Apoptose), die hyperphosphorylierte Form erlaubt den Übergang in die S-Phase (Proliferation). Die Überexpression von Cyclin D führt zur Phosphorylierung von RB und damit indirekt zur Inaktivierung des Restriktionspunktes und folglich zu einer erhöhten Zellzyklusprogression (Kato *et al.*, 1993; Morgan, 1997; Massagué, 2004).

Das Fortschreiten des Zellzyklus wird durch extrazelluläre Reize stimuliert. Zu den Rezeptoren, deren Signalwege den Übergang von der G_1 in die S-Phase vermitteln, gehören u.a. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Zelladhäsionsmoleküle (Bartek *et al.*, 1997). Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist an der Regulation der Aktivität von Cyclin D-abhängigen Kinasen beteiligt. Die Bindung eines Liganden an das 170 kDa große Transmembran-Glykoprotein verursacht eine Konformationsänderung. Die darauf folgende Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle aktiviert die Tyrosin-Kinasen der

zytoplasmatischen Domänen und führt zu deren Autophosphorylierung (Hackel *et al.*, 1999; Scagliotti *et al.*, 2004). Auf diese Weise wird das Signal, nicht aber der Informationsträger selbst, in die Zelle weitergeleitet. Die EGF-R-Dimere besitzen verschiedene Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Sie dienen als Bindungsstellen für eine Reihe intrazellulärer Signalmoleküle, die das Signal ihrerseits über eine Kaskade von Protein-Phosphorylierungen zum Zellkern weiterleiten (Lavoie *et al.*, 1996; Olayioye *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 1999; Schäffer & Weber, 1999). Zunächst bindet das Adaptormolekül GRB2 („Growthfactor Receptor-Bound Protein 2“) an den EGF-R, wodurch seinerseits SOS („son of sevenless“) rekrutiert wird. SOS ist ein Austauschfaktor, der durch die Übertragung eines Phosphatrestes auf das GTP (Guanosin-Triphosphat)-abhängige Signalprotein Ras dafür sorgt, dass dieses in seine aktive Form überführt wird. Ras löst seinerseits eine Phosphorylierung der Serin-Threoninkinase Raf aus, die wiederum die Serin/Threonin-Tyrosinkinase Mek phosphoryliert. Nach der darauf folgenden Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (Erk1/2) wird diese aus dem Zytoplasma in den Kern transloziert. Hier werden Transkriptionsfaktoren wie AP-1 phosphoryliert, die im Komplex mit anderen Proteinen an regulatorische Sequenzen der DNS binden (Karin & Shaulian, 2001).

Der EGF-R-regulierte Ras-Raf-Mek-Erk Signalweg spielt in der Regulation der Aktivität Cyclin D-abhängiger Kinasen eine entscheidende Rolle. Er ist für die Induktion der Proliferation durch verschiedene Partikeltypen beschrieben. Mittels Inhibitionsstudien konnte die Beteiligung des EGF-R und der MAPK (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen) Erk1/2 an der Proliferation durch Asbest (Buder-Hoffmann *et al.*, 2001; Manning *et al.*, 2002; Scapoli *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004), PM (Timblin *et al.*, 1998; Ramos-Nino *et al.*, 2002; Timblin *et al.*, 2002) und ufCB (Tamaoki *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Partikel-generierte ROS spielen dabei eine wichtige Rolle. Zusätzlich zu Erk sind noch zwei weitere Arten von MAP-Kinasen bekannt. Für die Jun-Kinasen (Jnk1/2) ist eine Beteiligung an der Apoptose, für p38 ist eine Beteiligung an Entzündungsprozessen beschrieben (Wilkinson & Millar, 2000; Kaminska, 2005; Lee & Dominguez, 2005).

Neben der hier beschriebenen Aktivierung durch eine exogene Noxe ist auch eine autokrine Aktivierung des EGF-R durch Heparin-bindendes-EGF, Amphiregulin oder Betacullin möglich. Diese von der Zelle sezernierten Wachstumsfaktoren induzieren eine autokrine Schleife, die mit einer erhöhten Proliferationsrate verbunden ist (Fontanini *et al.*, 1998; Booth *et al.*, 2001; Bonner, 2002; Scagliotti *et al.*, 2004).

Mendelsohn (2001) weist darüber hinaus auf eine kritische Rolle der autokrinen Rezeptor-Aktivierung für das Wachstum von Lungen-Tumoren hin. *In vitro* Versuche mit DEP (Marano *et al.*, 2002) und ufCB (Tamaoki *et al.*, 2004) unterstreichen die Rolle einer autokrinen Schleife unter Beteiligung des EGF-R bei der Partikel-induzierten Proliferation.

Neben dem EGF-Rezeptor sind auch Integrine an der Signal-Weiterleitung zur Induktion von Proliferation und Apoptose beteiligt. Integrine sind Transmembranrezeptoren, welche die Extrazelluläre Matrix (EZM) mit dem Zytoskelett der Zelle verbinden. Alle Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Die Bindungsspezifität eines bestimmten Integrins hängt von der jeweiligen Kombination aus α - und β -Kette ab. Bis heute sind 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Ketten beschrieben (Hynes, 1987; Ruoslahti & Pierschbacher, 1987; Hynes, 1992; Ruoslahti, 1999). Integrine besitzen eine repetitive Bindungssequenz, über die sie an eine spezifische Aminosäure-Sequenz (RGD, Arg-Gly-Asp) der EZM-Proteine binden können. Sie sind in der Lage, Signale von beiden Seiten der Zellmembran durch sie hindurch zu übermitteln. Einerseits wird die extrazelluläre Bindungsaktivität der Integrine durch Konformationsänderung und die Ausbildung von Clustern durch intrazelluläre Signale beeinflusst. Andererseits induziert die Bindung an EZM-Proteine Signale, die von außen in die Zelle weitergeleitet werden. Dieser Prozess der Signalübertragung wird als „inside-out“ bzw. „outside-in“ bezeichnet (Williams *et al.*, 1994; Clark & Brugge, 1995; Dedhar & Hannigan, 1996; Aplin *et al.*, 1998; Schönwälder & Burridge, 1999).

Signale werden durch Dimerisierung und einer damit verbundenen Konformationsänderung der Integrinrezeptoren ins Zellinnere übertragen (Humphries *et al.*, 2004). In den Fokalkontakten, der Bindungsstelle zwischen Integrinen und Zytoskelett, sind verschiedene Kinasen lokalisiert, die Signale über eine Kaskade von Protein-Phosphorylierungen zum Zellkern übertragen. Zu ihnen zählen die fokale Adhäsionskinase (FAK), die Integrin-gebundene-Kinase (ILK) und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die wiederum die Protein-Kinase B (PKB/Akt) phosphorylieren kann. Integrine sind auch durch eine Interaktion mit SOS mit dem EGF-Rezeptor-Ras-Signalweg und damit an der Progression des Zellzyklus beteiligt (Chen *et al.*, 1994; Giancotti & Ruoslahti, 1999; Wilkinson & Millar, 2000). Obwohl beide Rezeptorfamilien Signale auch unanhängig voneinander weiterleiten, führt häufig erst ein Zusammenspiel zwischen den Rezeptoren zur Entscheidung, welcher Signalweg aktiviert wird

(Eliceiri, 2001; Schwartz & Assoian, 2001; Cabodi *et al.*, 2004; Mattila *et al.*, 2004). Neben der Regulation über den Ras-Raf-Mek-Erk-Signalweg wird die Expression der D-Cycline und damit der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus auch über β_1 -Integrin und die PI3K-PKB Kaskade reguliert (Howe *et al.*, 1998; Sethi *et al.*, 1999; Schwartz & Assoian, 2001; Vivanco & Sawyers, 2002; Massagué, 2004). Über Integrin-vermittelte Partikel-Effekte ist bisher wenig bekannt. Berken und Mitarbeiter (2003) konnten in einer Ratten-Pleura-Mesothel-Zelllinie eine Asbest-induzierte Phosphorylierung von PKB nachweisen, die β_1 -Integrin-vermittelt ist. Ob Integrine auch an der mittels uFP induzierten Proliferation beteiligt sind, wurde bisher nicht untersucht.

Der Verlust der Integrin-EZM-Verbindung führt in vielen Zelltypen zur Anoikis, einer besonderen Form der Apoptose. Sie wird über FAK und PKB reguliert (Frisch & Ruoslahti, 1997; Ruoslahti, 1999; Evan & Vousden, 2001; Campell *et al.*, 2003). PKB inhibiert die Apoptose durch die Phosphorylierung von Bad, einem pro-apoptotischen Mitglied der Familie der Bcl-2-Proteine (Frisch & Ruoslahti, 1997; Attwell *et al.*, 2000; Wilkinson & Millar, 2000). Da verschiedene Integrine in Lungentumoren nur schwach exprimiert werden, führt der Kontaktverlust der Zelle mit der EZM hier nicht zur Induktion der Apoptose (Giancotti & Mainiero, 1994; Tsuji, 2004).

1.3 Apoptose

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein essentieller Prozess bei der normalen Embryonalentwicklung und Gewebedifferenzierung, wird aber auch zur gezielten Elimination geschädigter Zellen induziert. Sie ist durch charakteristische, morphologische (Chromatin-Kondensation, Kernfragmentierung, Schrumpfen der Zelle) und biochemische Veränderungen (DNS-Fragmentierung in 180 kDa große Fragmente, Ausschüttung von Cytochrom-c [Cyt-c], Caspase-Aktivierung und Phosphatidylserin-Translokation) gekennzeichnet, die sie von der Nekrose (Zellschwellung, Zerstörung der Organellen, Freisetzung des Zytoplasmas, Entzündung) unterscheiden (Krömer *et al.*, 1998; Cory *et al.*, 2003; Derradji & Baatout, 2003; Fadeel & Orrenius, 2005). Die morphologischen Veränderungen der Apoptose werden durch die Aktivierung der Caspasen induziert. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die durch die Spaltung ihrer Substrate hinter einem Aspartat-Rest

gekennzeichnet sind. Sie liegen als inaktives Zymogen (Procaspase) in der Zelle vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert (Cohen, 1997; Wolf & Green, 1999). Caspasen werden, je nachdem ob sie an der Initiation der Apoptose oder dem Abbau von Proteinen beteiligt sind, in Initiator-Caspasen bzw. Effektor-Caspasen unterteilt. Verschiedene Krankheiten wie Alzheimer, Diabetes und Tumoren sind mit einer fehlgesteuerten Apoptose assoziiert (Hanahan & Weinberg, 2000; Delhalle *et al.*, 2003).

Die Signalwege der Apoptose lassen sich in extrinsische und intrinsische Wege unterteilen (Abb. 3). Der extrinsische Weg wird über Transmembran-Todesrezeptoren der CD95-Familie gesteuert. Zu ihnen gehören FAS, TNF- α und TRAIL. Die Bindung eines Liganden führt zur Rezeptor-Trimerisierung, die eine Rekrutierung von Adapter-Proteinen zur Folge hat. Die Adapter-Proteine bilden zusammen mit Procaspase-8 den „death-inducing signaling complex“ (DISC) am zytoplasmatischen Ende des Rezeptors, der in der Aktivierung von Caspase-8 resultiert (Kischkel *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997; Walczak & Krammer, 2000; Delhalle *et al.*, 2003). Caspase-8 katalysiert die proteolytische Spaltung von Caspase-3, die als Effektor-Caspase zelluläre Substrate wie das DNS-Reparaturenzym Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) spaltet (Cohen, 1997).

Der intrinsische Apoptose-Weg beginnt mit der Freisetzung von Cyt-c aus dem Inter-membranraum der Mitochondrien ins Zytosol und resultiert in der Formation des Apoptosoms, eines Caspase-aktivierenden Komplexes. Das Apoptosom ist aus Cyt-c, Adenosin-Triphosphat (ATP), Apoptose-Protease-Aktivierungs-Faktor (Apaf-1) und der Procaspase-9 aufgebaut und induziert die Aktivierung von Caspase-9 (Li *et al.*, 1997; Derradji & Baatout, 2003; Lowe *et al.*, 2004; Fadeel & Orrenius, 2005), die daraufhin Caspase-3 aktiviert. Über das Zusammenspiel der pro- (u.a. Bak, Bax, Bim und Bid) und anti-apoptotischen Mitglieder (u.a. Bcl-2 und Bcl-X_L) der Bcl-2-Familie wird die Freisetzung von Cyt-c reguliert. Als Reaktion auf einen Stimulus induziert Bax, das unter physiologischen Bedingungen ein Heterodimer mit Bcl-2 bildet (Oltvai *et al.*, 1993), die Formation von Poren in der Mitochondrienmembran, die in der Freisetzung von Cyt-c resultiert (Pavlov *et al.*, 2001). Das pro-apoptotische Protein Smac/DIABLO („second mitochondria derived activator of caspase / direct IAP-binding protein with low pI“) kann zusätzlich von den Mitochondrien freigesetzt werden und inhibiert die Caspase-inhibierenden IAP's („inhibitor-of-apoptosis protein“).

Die beiden beschriebenen Signalwege der Apoptose sind über Bid miteinander verbunden. Als ein Substrat von Caspase-8 lagert sich gespaltenes-Bid (t-Bid) in die Mitochondrien-Membran ein und vermittelt die Cyt-c-Freisetzung (Gross *et al.*, 1999; Wolf & Green, 1999).

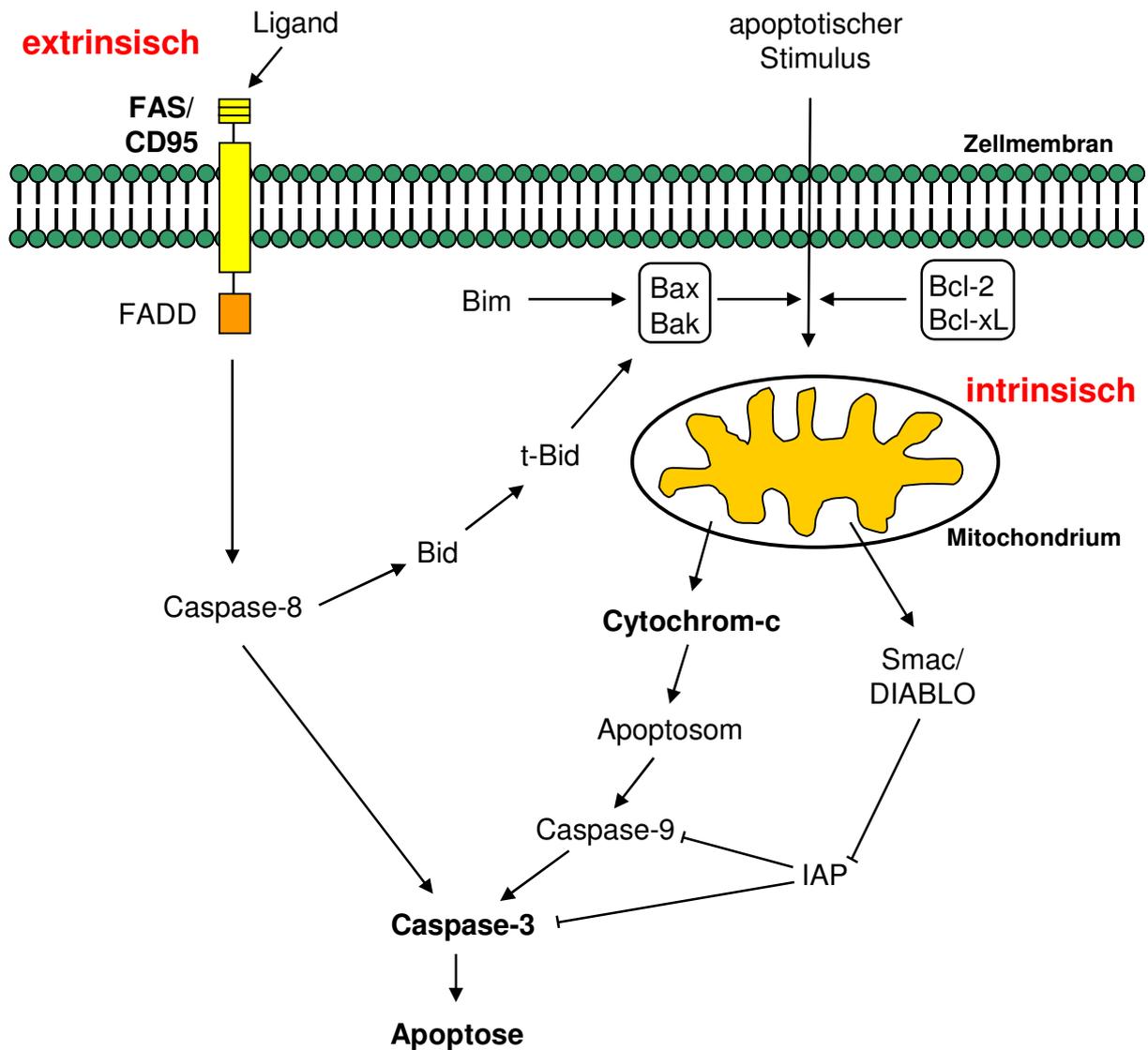


Abbildung 3: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose

Smac/DIABLO („second mitochondria derived activator of caspase / direct IAP-binding protein with low pI“), FADD („fas associated death domain“), IAP („inhibitor-of-apoptosis protein“)

—→ aktivierend —| inhibierend

Verschiedene *in vitro*-Studien geben Hinweise darauf, dass die MAP-Kinasen Jnk1/2 an der Regulation der Apoptose beteiligt sind (Kunduzova *et al.*, 2002; Cory *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). Bisher konnte zwar eine Aktivierung von Jnk durch eine Belastung mit Asbest und DEP gezeigt werden, doch wurde die Beteiligung an der Apoptose nicht untersucht (Zhang *et al.*, 2004). Für die Asbest-induzierte Apoptose konnte aber eine Beteiligung des EGF-R (Zanella *et al.*, 1999) und von β_1 -Integrin (Sandhu *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Beide Rezeptoren induzieren Signalwege über Jnk. Die Apoptose kann durch verschiedene Partikeltypen ausgelöst werden. Es ist bekannt, dass bestimmte Partikelcharakteristika wie Größe und Oberfläche einen Einfluss auf die Induktion der Apoptose besitzen. Wie schon in Kapitel 1.1 beschrieben, sind Partikel in der Lage, ROS zu generieren. Martindale und Holbrook (2002) postulieren, dass die Apoptose in verschiedenen Zelltypen durch oxidativen Stress vermittelt wird. Diese These konnte für verschiedene Partikeltypen belegt werden. So sind Partikel-induzierte ROS für die Induktion der Apoptose nach Belastung mit Asbest (Broaddus *et al.*, 1996; Kamp *et al.*, 2002; Shukla *et al.*, 2003a; Panduri *et al.*, 2004), DEP (Matsuo *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003), PM_{2.5} (Timblin *et al.*, 2002) und Quarz (Thibodeau *et al.*, 2004) verantwortlich.

Es gibt Hinweise, dass auch die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration die Apoptose in verschiedenen Zelltypen auslöst (Adams *et al.*, 2001; Orrenius, 2004). Kalzium-Ionen sind ebenso wie ROS in der Lage, Poren in der Mitochondrienmembran zu öffnen und damit die Freisetzung von Cyt-c zu vermitteln (Krömer *et al.*, 1998). Verschiedene Partikeltypen führen zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration in der Zelle (Donaldson *et al.*, 2002; Donaldson & Stone, 2003; Donaldson *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004; Möller *et al.*, 2005). Der direkte Beweis, dass der Partikel-induzierte Kalziumeinstrom an der Partikel-induzierten Apoptose beteiligt ist, konnte aber bisher nicht erbracht werden.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der molekularen Mechanismen der durch ultrafeine Partikel induzierten Apoptose und Proliferation. Zu diesem Zweck wurde ein Versuchsmodell mit Rattenlungenepithelzellen (RLE-6TN) etabliert und die folgenden Fragen bearbeitet:

1. Sind ultrafeine Partikel aufgrund ihrer Größe in der Lage, in Lungenepithelzellen Apoptose und/oder Proliferation auszulösen?
2. Haben die Größe und/oder die chemische Zusammensetzung der Partikel einen Einfluss auf Apoptose und Proliferation? Handelt es sich bei der Partikel-induzierten Proliferation um eine Kompensation der Apoptose?
3. Welche intrazellulären Signalwege werden von den Partikeln aktiviert? Sind Membranrezeptoren an der Signalübertragung beteiligt?
4. Was sind die initialen Ereignisse, die zur Induktion von Apoptose und Proliferation führen?
5. Über welchen Weg wird die Partikel-induzierte Apoptose vermittelt? Handelt es sich um eine Todesrezeptor-gesteuerte Apoptose, oder wird sie mitochondrial dirigiert?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein ausschließlich aus Kohlenstoff bestehender Modellpartikel (Carbon Black) verwendet, welcher ein repräsentativer Umweltpartikel aus Verbrennungsprozessen ist. Im Gegensatz zu den in bisherigen Studien häufig verwendeten Umweltstäuben, d.h. komplexen Gemischen aus verschiedenen Partikeltypen und Größen, die mit Metallen, PAH's und anderen Substanzen beladen sein können, ist Carbon Black zur Untersuchung des reinen Partikel-Effekts geeignet.

Mit diesen mechanistischen Studien sollte ein Beitrag zur Risikoabschätzung ultrafeiner Partikel geleistet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien höchstmöglicher Reinheit der Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) verwendet. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt, welches über eine Millipore-Anlage (Membrapure, Bodenheim) aufbereitet worden war.

2.1.1 Partikel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Sorten von Partikeln von unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung, Größe, Oberfläche und Löslichkeit untersucht (Tab. 1). Printex[®] 90, aus reinem Kohlenstoff bestehende ultrafeine Partikel (ufCB), wurde von Degussa (Frankfurt) bezogen. Zusätzlich wurden feine Kohlenstoff-Partikel (CB; Huber 990 von H. Haefner & Co. Ltd, Chepstow) und ultrafeine amorphe Silica-Partikel (SiO₂; Sigma) verwendet. Die Partikel wurden als Stammsuspensionen mit einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS eingesetzt. Unmittelbar vor der Belastung der Zellen wurden die Partikel-Suspensionen für 60 min im Ultraschallbad (Bransonic 220 von Fisher, Schwerte) mit 50 - 60 kHz, 120 V beschallt.

Tabelle 1: Charakteristika der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Partikel

	ufCB [Printex 90]	CB [Huber 990]	SiO₂ [amorphes Silica]
ø [nm]	14	260	14
Oberfläche [m ² /g]	300	8	200
Masse [g/mol]	12	12	60
Partikelverhältnis/Masse	5	5	1
Löslichkeit in H ₂ O	-	-	+

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die SV40-transfizierte Rattenlungenepithel Zelllinie RLE-6TN (Driscoll *et al.*, 1995; ATCC Rockville, USA) wurde als Monolayer-Kultur in Nutrient Mixture Ham's F-12, das mit 5% [v/v] hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2,5 µg/ml Amphotericin B, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin (Sigma) supplementiert war, auf Plastik-Gewebekulturflaschen bei 37°C, 5% [v/v] CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 - 3 Tage mit auf 37°C vorgewärmtem Medium durchgeführt.

Die Zellen wurden alle 7 Tage nach Erreichen 80 - 90%iger Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Ham's F12 (5% FCS) inaktiviert, die Zellen abgeschabt, resuspendiert und 6 min bei 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Ham's F12 Medium aufgenommen und die Zellen im Verhältnis 1:10 in eine Kulturflasche ausgesät.

2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm²) bis zur Konfluenz kultiviert und wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben isoliert und pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml Ham's F12 Medium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml Einfriermedium (22% [v/v] DMSO in FCS) wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und nach 24 h zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Für die Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen auf 37°C erwärmt, in 4 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine 25 cm² Kulturflasche ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

2.2.3 Belastung der Zellen

Zellen wurden mit einer Dichte von $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausplattiert und für ca. 20 h bis zu einer Konfluenz von 80 - 90% in Kompletmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in serumarmem Medium (0,5% FCS) gehalten. Die Partikelkonzentration, mit der die Zellen belastet wurden, variierte von 1 bis $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Bei gleichzeitiger Verwendung verschiedener Inhibitoren wurden die Zellen für 1 h mit der entsprechenden Substanz bzw. mit der Lösungsmittelkontrolle vorbehandelt. Die Endkonzentration des Lösungsmittels betrug in allen Experimenten 0,1%. Im Detail wurden die in Tabelle 2 zusammengefassten Inhibitoren verwendet.

Tabelle 2: Zusammenfassung der benutzten Inhibitoren

Inhibitor	Lösungsmittel	Hersteller
Anti-CD29 (β 1-Integrin-blockierender Antikörper Ha2/5)	PBS	BD PharMingen, San Diego, CA
Caspase-3-Inhibitor (CPP32/Apopain Inhibitor); AC-DEVD-CHO [N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO]	DMSO	BD Biosciences, San Diego, CA
Caspase-3-Inhibitor , zellpermeabel; DEVD-CHO [Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Asp-Glu-Val-Asp-CHO]	DMSO	BD Biosciences, San Diego, CA
Caspase-8-Inhibitor ; Z-IETD-FMK [Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-CH ₂ F]	DMSO	Calbiochem, San Diego, CA
Diphenyleneiodonium (DPI)	DMSO	AG Scientific, San Diego, CA
Peptid gegen β1-Integrin : RGDS; H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH	5% HAc	Calbiochem, San Diego, CA
Kontrollpeptid : GRADSP; H-Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-OH	PBS	Calbiochem, San Diego, CA
N-Acetyl-Cystein (NAC)	H ₂ O	Sigma, St.Louis, MI
Wortmannin	DMSO	Alexxis Biochemicals, San Diego, CA
Ly 294002 ; 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one	DMSO	Alexxis Biochemicals, San Diego, CA
SH-5 ; D-3-Deoxy-2-O-methyl-myo-inositol-1-[(R)-2-methoxy-3-(octadecyloxy)propyl-hydrogen-phosphate]	H ₂ O	Calbiochem, San Diego, CA
Pd 98059	DMSO	New England Biolabs, Beverly, MA
Verapamil	H ₂ O	Sigma, St.Louis, MI
Tyrphostin AG 1478 ; 4-[3-chloroanilino]-6,7-dimethoxyquinazoline	DMSO	Calbiochem, San Diego, CA
SP 600125 ; Anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one;1,9-Pyrazoloanthrone	DMSO	AG Scientific, San Diego, CA
JNK Inhibitor 1 Peptid (L-stereoisomer); GRKKRRQRRR-PP-RPKRPTTLNLFQVPRSQD-amide	PBS	Axxora, San Diego, CA

Außerdem wurden die Zellen für verschiedene Experimente mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Substanzen behandelt.

Tabelle 3: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Induktoren

Substanz	Lösungsmittel	Hersteller
Epidermal Growth Factor (EGF)	H ₂ O	Chemicon, Temecula, CA
FAS-Ligand	PBS	R&D Systems, Minneapolis, MN
Staurosporin, aus <i>Streptomyces sp.</i>	DMSO	Sigma, St.Louis, MI

2.3 Zytotoxizitätsassays

Damit in den Versuchen Partikelkonzentrationen eingesetzt werden konnten, die für die Zellen nicht toxisch sind, wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe des Laktat-Dehydrogenase-Assays untersucht. Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein in allen Säugetierzellen vorhandenes zytoplasmatisches Enzym. Es katalysiert die gegenseitige Umwandlung von Pyruvat und Laktat, einem essentiellen Schritt im Energiestoffwechsel der Zelle, und wird nach dem Verlust der Membranintegrität aus dem Zytoplasma ins umgebende Medium freigesetzt (Rae, 1977). Die Höhe der LDH-Aktivität im Überstand ist somit ein Maß für die Zytotoxizität der Partikel.

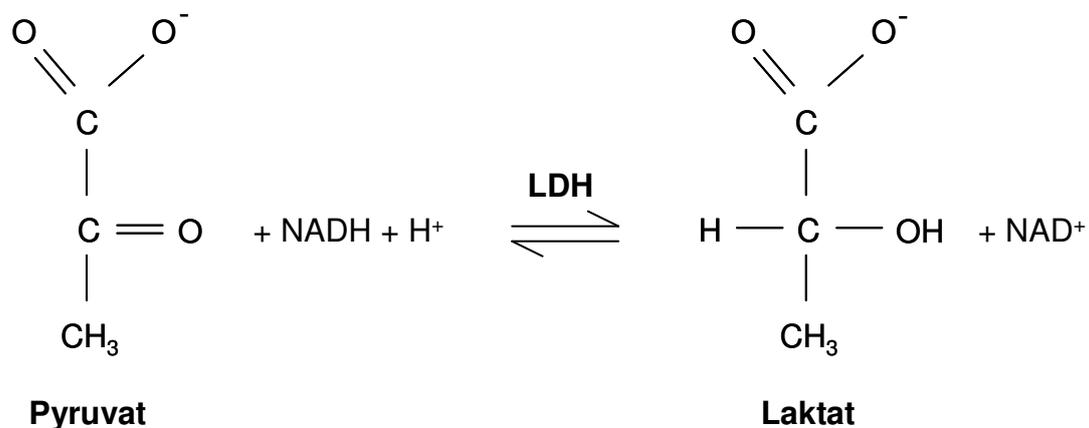


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Überführung von Pyruvat in Laktat

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde der Zellüberstand abgenommen und für 5 min bei 14.000 *g* zentrifugiert, um tote Zellen und Partikel abzutrennen. Der Überstand wurde für 24 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Überstand zu 50 µl NADH-Lösung (1 mg/ml in 0,75 mM Natrium-Pyruvat) pipettiert und gut gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 50 µl 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,2 mg/ml in 1 N HCl) hinzu gegeben und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 4 N NaOH wurde die Absorption der Proben bei 540 nm mit Hilfe eines Microplate-Readers (Multiskan Ascent 96; MTX Lab Systems, Vienna, VA) gemessen. Nicht umgesetztes Pyruvat bildet mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin einen farbigen Komplex. Die Absorption des Komplexes bei 540 nm ist umgekehrt proportional zur LDH-Aktivität.

2.4 Proliferationsassay

Ein Maß für die Proliferationsrate von Zellen ist der Einbau von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in die DNS. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das während der S-Phase des Zellzyklus kompetitiv anstelle des Thymidins in die neu synthetisierte DNS eingebaut wird. Mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten BrdU-spezifischen Antikörpers lässt sich das in die DNS inkorporierte BrdU nachweisen. Die von der Peroxidase katalysierte Spaltung des Substrats führt zu einem Farbumschlag von hell zu dunkel grün. Er stellt ein Maß für die Zell-Proliferation dar.

Zellen wurden mit einer Dichte von $3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ mit jeweils 100 µl Zellkulturmedium/Kulturgefäß in Multiwellplatten ausgesät und wie in 2.2.3 beschrieben behandelt. 4 - 6 h vor der Fixierung der Zellen wurden 10 µl BrdU-Lösung (Endkonzentration 10 µM; 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III; Roche, Mannheim) zu dem Zellkulturmedium gegeben. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 200 µl Lösung A (10% [v/v] FCS in PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl Lösung B (70% [v/v] Ethanol; 0,5 M HCl) für 30 min bei -20 °C fixiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit Lösung A (dreimal) wurde die DNS für 30 min bei 37 °C mit 100 µl Nuklease-Lösung (Roche) inkubiert. Die Zellen wurden wieder dreimal mit Lösung A gewaschen und anschließend für 30 min bei 37 °C mit 100 µl einer anti-BrdU-POD Antikörper-Lösung (anti-BrdU-Peroxidase, 0,2 U/ml; Roche) inkubiert. Im letzten Schritt wurden die

Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bei RT für 20 min mit 100 µl ABTS-Lösung (2,2'-Azino-di[3-ethyl-benz-thiazolin]-6-sulfonat) inkubiert. Die an den Antikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Umsetzung des ABTS zu einem farbigen Produkt, dessen Absorption bei 405 nm mit einem ELISA-Reader (Dynatec MR 5000; Dynatec Laboratories, Chantilly) gemessen wurde.

2.5 Apoptoseassays

2.5.1 TUNEL („transferase-mediated dUTP nick end labeling“)

Die Spaltung der DNS ist ein Schlüsselereignis der Apoptose. Mit dem hier verwendeten TUNEL-Assay können DNA-Einzelstrangbrüche, so genannte „nicks“, detektiert werden. Dabei werden die freien 3'OH-Enden der gespaltenen DNS, mit Hilfe einer terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT), mit einem Fluoreszeinmarkierten Nukleotid (dUTP) enzymatisch verbunden (Gavrieli *et al.*, 1992).

Für die TUNEL-Färbung wurden die Zellen mit einer Dichte von $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ auf Objektträgern ausplattiert und wie in 2.2.3 beschrieben behandelt. Die Zellen wurden an der Luft getrocknet und anschließend für 1 h in 4%iger Paraformaldehydlösung (pH 7,4 in PBS) bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 2 min bei 4°C mit 0,1% Triton X-100 (in 0,1% Natriumcitrat) permeabilisiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS. Um in der Positivkontrolle DNS-Strangbrüche zu induzieren wurden die permeabilisierten Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit DNase I (100 U/ml in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 1 mg/ml BSA) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37°C mit 50 µl TUNEL-Reaktionslösung (zusammengesetzt aus Transferase und Fluoreszeinmarkierten Nukleotiden; *In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche, Penzberg) in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde keine Transferase zugegeben, sonst aber wie oben verfahren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Vectashield® Einbettmedium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Hamburg) analysiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte bei jeder Probe in vier zufällig ausgewählten Arealen mit Hilfe der analySIS® 3.2 Software (Soft imaging System, Münster), indem die Fluoreszenzintensität bestimmt wurde.

2.5.2 Caspase-3-Aktivitätsassay

Als ein weiterer Marker der frühen Apoptose kann die Aktivität der Caspase-3 bestimmt werden. Caspase-3 liegt als inaktives Zymogen in der Zelle vor und kann sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen Signalweg aktiviert werden. Die Aktivität der Caspase kann durch den Umsatz eines chromogenen Peptidsubstrats gemessen werden.

Zellen wurden mit einer Dichte von $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausplattiert und wie in 2.2.3 beschrieben behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in 180 μl Lyse-Puffer (10 mM Tris-HCl; 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$, pH 7,5; 130 mM NaCl; 1% [w/v] Triton-X-100; 10 mM NaPPi; Caspase-3 Kit [BD Biosciences, San Diego, CA]) geerntet, für 30 min auf Eis inkubiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben zum Aufschluss der Zellen bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut, mit Hilfe einer 20 gauche Kanüle geschert und für 15 min bei 4°C mit 20.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

In eine Mikrotiterplatte wurden 100 μl Zellysate, 5 μl Substrat (Ac-DEVD-pNA [N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide]; Sigma) und 100 μl 1x HEPES-Puffer gegeben, die Proben kurz geschüttelt und dann für 60 min bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe zusätzlich mit 5 μl Caspase-3-Inhibitor (Endkonzentration 50 μM ; Ac-DEVD-CHO [N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO]) versetzt. Die Absorption der Proben bei 405 nm wurde mit einem ELISA-Reader (Dynatec MR 5000; Dynatec Laboratories, Chantilly) gemessen.

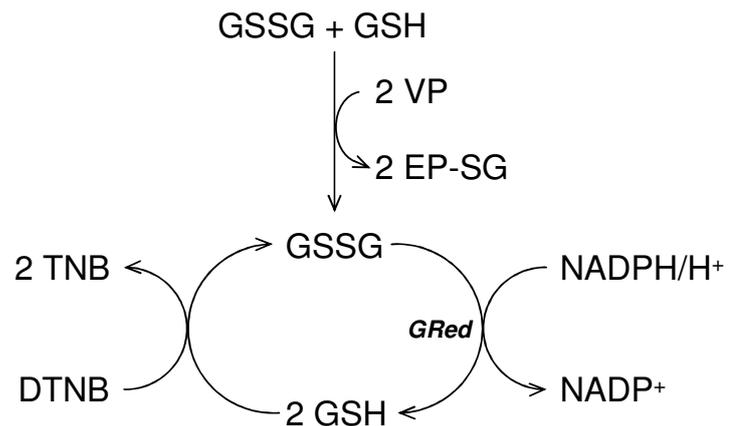
2.6 Bestimmung von Glutathion und Glutathiondisulfid

Die Messung von Glutathion erfolgte nach Anderson (1985) mittels eines gekoppelten enzymatisch-optischen Tests, wobei die zweite Reaktion durch die Glutathion-Reduktase katalysiert wird (Abb. 5). Durch die Reaktion mit 2,2'-dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure (DTNB) werden 2 Moleküle Glutathion (GSH) zu einem Molekül GSSG oxidiert. Bei dieser Reaktion entsteht das farbige Thionitrobenzoat-Anion (TNB), welches ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist (Ellman, 1959). Entstandenes GSSG wird unter Verbrauch von NADPH durch die Glutathion-

Reduktase (GRed) enzymatisch reduziert. Da das dabei entstandene GSH erneut mit DNTB reagiert, werden bei dieser Reaktion GSH und GSSG gleichermaßen erfasst. Zur alleinigen Bestimmung von GSSG muss GSH zunächst mit 2-Vinylpyridin (VP) derivatisiert werden und nimmt dann nicht mehr am beschriebenen zyklischen Prozess teil.

Abbildung 5: Prinzip des GSH/ GSSG Redoxzyklus

GSH wird zu GSSG oxidiert. Das dabei entstehende TNB gilt als Maß für die GSH-Menge. Zur alleinigen Bestimmung von GSSG muss GSH zunächst mit VP derivatisiert werden, so dass es nicht mehr am zyklischen Prozess teilnehmen kann.



Für die Glutathion-Bestimmung wurden Zellen in 56 cm² Schalen kultiviert und nach der entsprechenden Belastung mit eiskaltem PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig abgesaugt war, wurden die Zellen durch Einfrieren bei -80 °C aufgeschlossen. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 150 µl 0,01 N HCl lysiert und für ca. 20 sec auf Eis sonifiziert. 140 µl des Zelllysats wurden in neue Eppendorfgefäße überführt, der Rest wurde für die Proteinbestimmung (2.7.3) verwendet. Standardreihen aus GSH und GSSG wurden über den ganzen Versuch ebenso behandelt wie die Proben. Zu dem Lysat (140 µl) wurden 47,6 µl 20 % 5-Sulfosalicylsäure (SSA) pipettiert, die Proben gemischt und abzentrifugiert. 40 µl wurden sofort für die Bestimmung des Gesamtglutathions verwendet, 100 µl des Überstandes wurden zur Bestimmung von GSSG eingesetzt. Die Bestimmung von GSSG erfolgte nach der Derivatisierung des reduzierten Glutathions, indem 6 µl Triethanolamin und 2 µl 2-VP zu 100 µl der Probe gegeben wurden. Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Reaktionslösung bestand aus 340 µl Reaktionspuffer (200 mM Tris, pH 8; 1,5 mM NADPH; 0,1 mM EDTA), 40 µl Standard bzw. Probe und 20 µl DTNB (Stammlösung

10 mM). Durch Zugabe von 10 µl Glutathion-Reduktase (1 U/µl; Sigma) wurde die Reaktion gestartet. Mit Hilfe eines ELISA-Readers (Multiskan Ascent 96; MTX Lab Systems, Vienna) wurde die Absorption bei 412 nm gemessen. Die Quantifizierung von GSH und GSSG erfolgte jeweils anhand der Steigung der Standardkurven und durch eine Normalisierung auf den Proteingehalt der Proben.

2.7 Gelelektrophorese und Western-Blot

2.7.1 Herstellung von Proteinextrakten

Proteinextrakte zur Western-Blot-Analyse wurden durch direkte Lyse der Zellen mit Radionimmunopräzipitations (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] Desoxycholat; 0,1% [w/v] SDS; 0,025% [w/v] NaN₃) hergestellt. Dem RIPA-Puffer wurde 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Sigma) und 1% Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem) jeweils frisch zugesetzt. Für eine 25 cm² Kulturflasche wurden 50 µl RIPA-Puffer verwendet, die Zellen darin abgeschabt, für 30 min bei 4°C inkubiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut, geschert, für 15 min bei 4°C mit 20.000 g abzentrifugiert und der Überstand verwendet.

2.7.2 Isolierung zytoplasmatischer Proteine

Zur Gewinnung zytoplasmatischer Proteinextrakte (ohne Zellorganellen) wurden die Zellen in PBS geerntet, für 10 min bei 4°C bei 20.000 g zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Puffer A (10 mM HEPES/KOH, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT) resuspendiert. Nach der Inkubation auf Eis (10 min) und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 50 µl Puffer A (1% Protease Inhibitor [Calbiochem]) gelöst und mit Hilfe eines Teflon Pistills homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 10 min bei 4°C mit 1.000 g zentrifugiert. Zu dem in Zentrifugenröhrchen überführten Überstand wurden 5 µl Puffer B (0,3 M HEPES/KOH, pH 7,9; 1,4 M KCl; 30 mM MgCl₂; 1% Protease Inhibitor) gegeben, die Proben für 1 h bei 4°C mit 35.000 g in

der Ultrazentrifuge (L8-70M, Beckmann, München) mit dem SW-28 Rotor sedimentiert und der Überstand verwendet.

2.7.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten zur Western-Blot-Analyse erfolgte mit Hilfe der Methode nach Lowry (1951) unter Verwendung kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad DC Protein Assay) gegen Standards aus Rinderserumalbumin (Sigma). Aliquots der Proteinlösungen wurden in Multiwell-Platten pipettiert und für 10 min mit der DC-Lösung inkubiert. Dabei reduzieren die aromatischen Aminosäurereste das so genannte Folin-Reagenz. Der daraus resultierende Farbumschlag von gelb nach blau konnte mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 630 nm gemessen werden.

2.7.4 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation (IP) des EGF-R wurden in 56 cm²-Kulturschalen kultivierte Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500 µl eiskaltem IP-Puffer (30 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% [w/v] Triton X-100; 10 mM NaF; 5 mM Na₃VO₄; 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail II; 1% Protease Inhibitor Cocktail Set III) geerntet. Unlösliches Zellmaterial wurde durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 20.000 g) in einer Mikrozentrifuge (3K30; Sigma) sedimentiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach Lowry (2.7.3) bestimmt und dann durch die Zugabe entsprechender Volumina IP-Puffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Zu jeder Probe wurden 4 µl Anti-EGFR-Antikörper (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) zugegeben und der Rezeptor mit Hilfe von Überkoprotation für 20 h bei 4°C präzipitiert. Anschließend wurden 100 µl Protein A-Agarose-Beads (50% Suspension in IP-Puffer; Upstate Biotechnology) zugegeben und für weitere 4 h bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden dreimal mit IP-Puffer gewaschen. Darauf folgend wurden die Proben in 50 µl 4-fach Elektrophoreseprobenpuffer (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; 40 mM DTT) aufgenommen, gründlich gemischt und für 5 min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 14.000 *g* zentrifugiert. Jeweils 20 µl des Überstandes wurden auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.7.5 Proteingelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Laemmli *et al.*, 1970). Die 1 mm dicken Gele wurden in zwei Schritten hergestellt. In ersten Schritt wurde je nach Größe der zu untersuchenden Proteine ein 7,5 - 16%iges Trenngel (7,5 - 16% Acrylamid [Acrylamid : Bisacrylamid, 30 : 0,8]; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% [w/v] SDS; 0,05% [v/v] APS; 0,02% [v/v] TEMED) gegossen und zum Polymerisieren mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol abgegossen und im zweiten Schritt ein 3%iges Sammelgel (3% Acrylamid [Acrylamid : Bisacrylamid, 30 : 0,8]; 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (v/v) APS; 0,02% (v/v) TEMED) auf das Trenngel geschichtet. Der Laufpuffer enthielt 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 0,1% [w/v] SDS. Die Gelläufe wurden bei einer maximalen Spannung von 120 V in Minigelkammern (Sigma) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst in 2-fach Elektrophoreseprobenpuffer (120 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2% [w/v] SDS; 20% [w/v] Saccharose; 1% [v/v] β-Mercaptoethanol, 0,1% [w/v] Bromphenolblau; 20 mM DTT) aufgenommen und 5 min bei 100°C inkubiert. Der Gellauf erfolgte zunächst bei 50 V, bis die Proben ins Trenngel eingelaufen waren, anschließend bei maximal 120 V.

2.7.6 Western-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, per Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Proton BA 83; Schleicher & Schuell, Dassel) oder eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid; Hybond-P; Amersham Pharmacia Biotech, Pittsburgh, PA) übertragen. Die PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm wurde zunächst

kurz in Methanol aktiviert und dann zusammen mit dem Gel in Anodenpuffer (39 mM Tris; 25 mM Ameisensäure; 1 mM SDS; 0,7 mM NaN_3 ; 20% [v/v] Methanol) äquilibriert. Die Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 μm musste nicht aktiviert werden und wurde sofort in Anodenpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Trans-Blot Semi-Dry Apparatur (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in folgender Reihenfolge von der Anode zur Kathode aufgebaut: drei mit Anodenpuffer getränkte Chromatographiepapiere - Membran - Gel - ein mit Anodenpuffer getränktes Chromatographiepapier - zwei mit Kathodenpuffer (17 mM Tris; 25 mM Taurin; 1 mM SDS; 0,7 mM NaN_3 ; 20% [v/v] Methanol) getränkte Chromatographiepapiere. Die Übertragung erfolgte für mindestens 60 min bei 100 mA (14 V). Als Kontrolle für einen erfolgreichen Transfer diente eine reversible Färbung der Proteinbanden mit PonceauS (0,1% (w/v) PonceauS in 5% [v/v] Essigsäure).

2.7.7 Immunologischer Proteinnachweis

Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubieren der Membran für 1 h in TBST (20 mM Tris/HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1% (w/v) Tween 20) mit 5% (w/v) Magermilchpulver blockiert. Für den spezifischen Proteinnachweis wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Primär-Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen in 5% [w/v] TBST/Magermilchpulver oder 5% [w/v] TBST/BSA verwendet.

Die Membran wurde bei 4°C über Nacht in der Antikörperlösung geschüttelt, dann viermal 5 min mit TBST gewaschen und für 2 h in der entsprechenden Sekundär-Antikörperlösung (Tab. 4) bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Membran von nicht gebundenem Zweitantikörper zu befreien, wurde sie erneut viermal 5 min mit TBST gewaschen. Der Nachweis der Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte mittels Chemilumineszenz-Reaktion. Dazu wurde die Membran für 5 min mit ECL Plus Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Pittsburgh, PA) inkubiert und die Lumineszenz zur Belichtung eines Röntgenfilms (Super RX; Fuji, Düsseldorf) genutzt.

Tabelle 4: Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper

	Zielprotein	Hersteller	Verdünnung
Primär- Antikörper	Caspase-3	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 9665	1:500 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	Caspase-9	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 9506	1:1000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	Cytochrom c	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 4272	1:1000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	EGFR	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, # 06-847	1:1000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	ERK1/2	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 9102	1:2000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	GAPDH	Imgenex, San Diego, CA, IMG- 5019A-1	1:10.000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	SAPK/JNK1/2	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 9252	1:2000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	PCNA	Abcam, Cambridge, UK, ab29	1:1000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	phospho-ERK1/2 [Thr202/Tyr204]	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 9101	1:1000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	phospho-SAPK/JNK1/2 [Thr183/Tyr185]	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 9251	1:1000 in 5% (w/v) TBST/BSA
	phospho-Tyrosin [P-Tyr-100]	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, # 9411	1:1000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
Sekundär- Antikörper	anti-mouse-HRP	Sigma, St.Louis, MI, A 4416	1:2000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver
	anti-rabbit-HRP	Sigma, St.Louis, MI, A 6154	1:2000 in 5% (w/v) TBST/Milchpulver

2.7.8 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Signalstärken auf den Röntgenfilmen wurde mittels densitometrischer Auswertung mit Hilfe des Programms „Quantity One 4.1.0“ (Biorad, Hercules, CA) vorgenommen.

2.7.9 Entfernen der Antikörper von Membranen

Um weitere Proteine mit anderen Antikörpern detektieren zu können und bereits gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und anschließend für 30 min im Wasserbad bei 70°C in „Stripping-Puffer“ (2% [w/v] SDS; 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM β -Mercaptoethanol) inkubiert. Nachdem die Membran kurz in TBST gewaschen wurde, konnte sie blockiert und erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden.

2.8 Statistik

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

3 ERGEBNISSE

Ultrafeine Partikel verursachen schwere Gesundheitsschäden und ein Ansteigen der Sterblichkeitsrate infolge von Lungenfibrose und Lungentumoren (Ferin *et al.*, 1992). Diese Erkrankungen werden auf unkontrollierte Proliferation und/oder eine verminderte Apoptoserate zurückgeführt (Manning & Patierno, 1996), zwei gegenläufige Prozesse, die sich unter physiologischen Bedingungen in einem kontrollierten Gleichgewicht befinden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der Partikel-induzierten Apoptose und Proliferation untersucht, die unter Normalbedingungen zwei aufeinander abgestimmte kompensatorische Prozesse darstellen.

3.1 Partikel-induzierte Apoptose

Verschiedene Partikeltypen wie Asbestfasern (Berube *et al.*, 1996; Broaddus *et al.*, 1996), feine Diesel-Partikel (Matsuo *et al.*, 2003) oder PM_{2.5} (Timblin *et al.*, 2002) sind in der Lage, die Apoptoserate von Lungenzellen zu verändern. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Apoptose auch durch reine Kohlenstoffpartikel induziert werden kann, da bisher vor allem Oberflächenmetalle und Polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAH's) als treibende Kraft der Partikel-induzierten Apoptose betrachtet wurden. Die Induktion der Apoptose durch ultrafeine Partikel (ufP) wurde mit Hilfe eines Caspase-3-Aktivitäts-Tests, Western-Blot-Analyse und des TUNEL-Assays in kultivierten Typ-II Rattenlungen-Epithelzellen überprüft.

Als Effektorcaspase übernimmt Caspase-3 in der Apoptose-Signalkaskade die Schlüsselrolle. Die Enzymaktivität kann im Assay durch Umsetzung eines Substrats (Ac-DEVD-pNA) zu einem farbigen Produkt gemessen werden. Die Absorption des Produkts bei 405 nm stellt ein Maß für die Enzym-Aktivität dar. Die zeitabhängige Aktivierung der Caspase-3 nach der Belastung mit 10 µg/cm² ultrafeinem Carbon Black (ufCB, Printex[®] 90) ist in Abbildung 6 dargestellt.

Es zeigte sich, dass Belastung mit ufCB zu einer zeitabhängigen Aktivierung von Caspase-3 in RLE-Zellen führt. Ein signifikanter Anstieg der Enzym-Aktivität konnte bereits nach 4 h gemessen werden. Der Maximalwert der ufCB-induzierten Apoptose

wurde nach 8 h beobachtet. Die Caspase-3-Aktivität war hier dreimal so hoch im Vergleich zum Null-Stundenwert. Auch nach 12 bzw. 24 h war noch eine signifikante Erhöhung der Caspase-3-Aktivität zu messen.

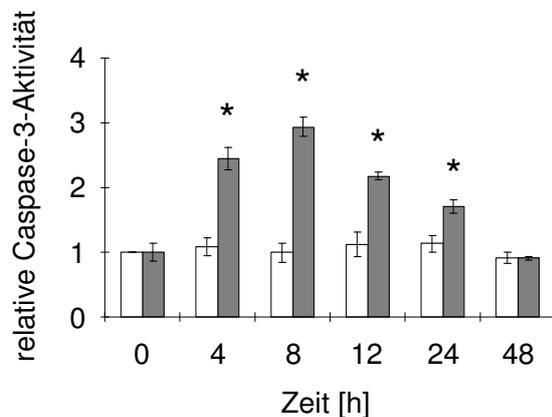


Abbildung 6: Induktion der Caspase-3-Aktivität durch ufCB

Als Maß für die Apoptose wurde die relative Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. Der PBS-Kontrollwert bei 0 h wurde gleich eins gesetzt. Weiße Säulen repräsentieren die PBS-behandelten Kontrollen, graue Säulen die mit ufCB-belasteten Proben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$

Um diese Daten zu bestätigen, wurde die Spezifität der Caspase-3-Aktivität für die ufCB-induzierte Apoptose in einem zweiten, unabhängigen Versuch überprüft. Zum Nachweis der Apoptose wurde die dosisabhängige Steigerung der Apoptose-spezifischen DNS-Fragmentierung mit Hilfe des TUNEL-Assays untersucht, in dem Transferase-vermittelt freie 3'OH-Enden der DNS mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden. RLE-Zellen wurden für 12 h mit aufsteigenden Dosen ufCB belastet oder mit den Apoptose-induzierenden Agenzien Staurosporin oder Fas-Ligand behandelt. Zur Verifizierung der Spezifität wurden Zellen zusätzlich zur Partikelbelastung für 1 h mit dem Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO vorbehandelt.

Auch mit Hilfe des TUNEL-Assays konnte die Partikel-induzierte Apoptose gemessen werden (Abb. 7). Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Partikeldosis zunahm. Sowohl eine Belastung mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ als auch $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB führten zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität, der mit dem Anstieg der Caspase-3-Aktivität (vgl. Abb. 9) vergleichbar ist. Eine Vorbehandlung mit dem Caspase-3-Inhibitor reduzierte die Fluoreszenzintensität signifikant. Die Behandlung der Zellen mit den Apoptose induzierenden Substanzen Staurosporin und Fas-Ligand führte dagegen zu einer signifikanten Zunahme der Fluoreszenzintensität. Das Ergebnis mit Fas-Ligand zeigt, dass die Apoptose in RLE-Zellen auch über den Todes-Rezeptor Fas (CD95) induziert werden kann.

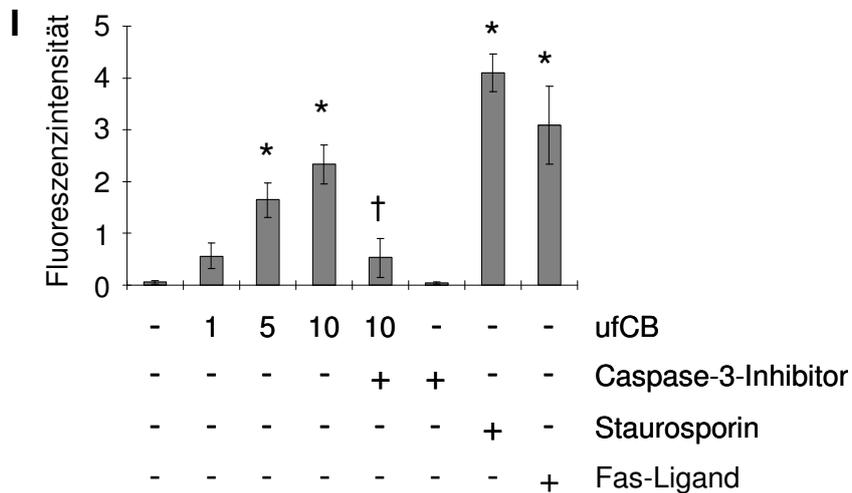
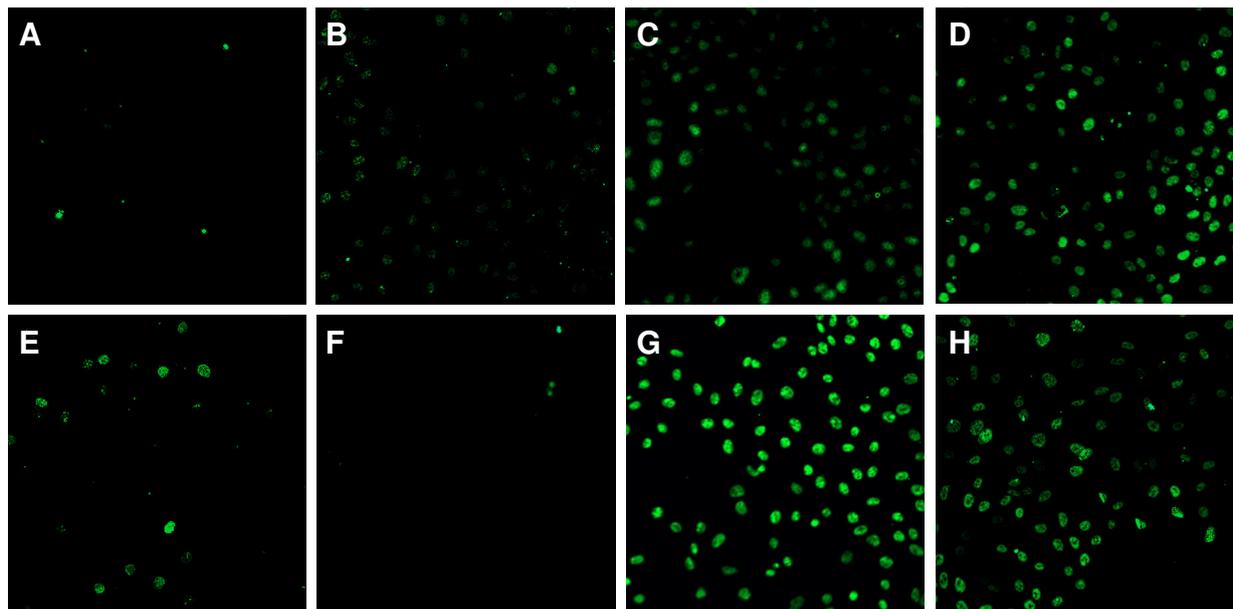


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Steigerung der ufCB-induzierten DNS-Strangbrüche

RLE-6TN-Zellen wurden für 12 h mit PBS (A), 1 (B), 5 (C) und 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB (D) belastet. (E) Vor der Belastung mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB wurden die Zellen für 1 h mit einem Caspase-3-Inhibitor (50 μM) behandelt. (F) Zellen, die nur mit dem Caspase-3-Inhibitor behandelt wurden. Induktion der Apoptose durch die Behandlung mit 100 nM Staurosporin (G) bzw. 100 ng/ml Fas-Ligand (H). (I) Graphische Auswertung der Fluoreszenzintensitäten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

* signifikanter Anstieg zur Kontrolle, † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, $p \leq 0,05$

Die Ergebnisse des TUNEL-Assays bestätigen auch die Resultate des Caspase-3-Aktivitätsassays zur Messung der ufP-induzierten Apoptose.

Die durch ufCB induzierte Apoptose konnte auch durch einen weiteren Assay, eine Western-Blot-Analyse, mittels eines spezifischen Caspase-3-Antikörpers nachgewiesen werden. Caspase-3 ist ein Protein, das als 35 kDa großes inaktives Zymogen (Procaspase) in der Zelle vorliegt. Es wird durch die proteolytische Spaltung in eine Prodomäne und die zwei Untereinheiten (19 und 12 kDa) geteilt. Die beiden Untereinheiten formieren sich zur aktiven Caspase (Cohen, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998; Derraji & Baatout, 2003).

In Abbildung 8A ist eine Western-Blot-Analyse für Caspase-3 dargestellt, in Abbildung 8B die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten. RLE-Zellen wurden für 8 h mit 10 µg/cm² ufCB belastet. Die Procaspase ist in Abbildung 8A als kräftige Bande bei 35 kDa zu erkennen. Der verwendete Antikörper erfasst zusätzlich zur Procaspase nur das 19 kDa große Spaltprodukt, das 12 kDa große Fragment wird nicht detektiert.

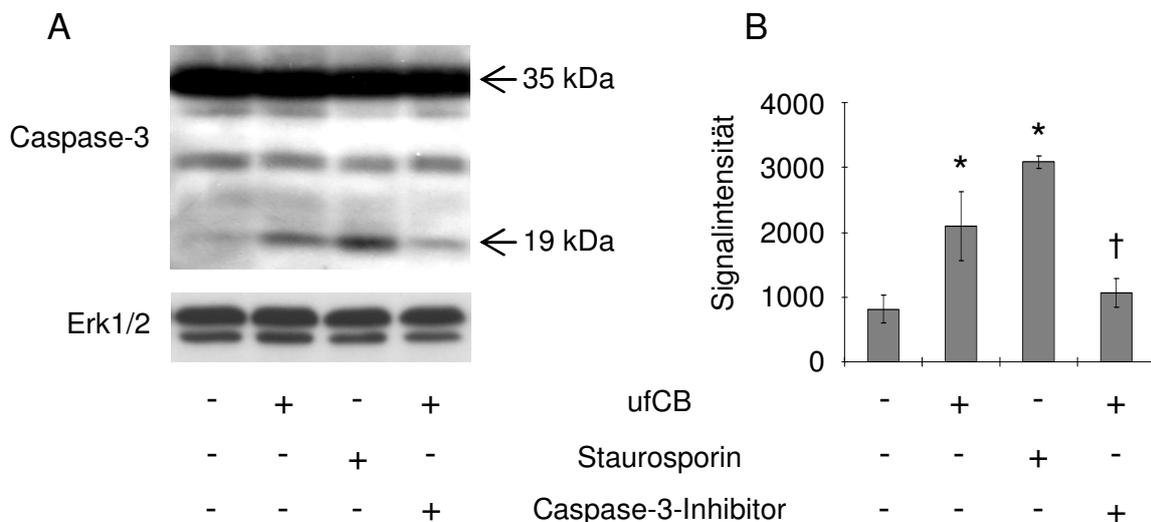


Abbildung 8: Nachweis der Caspase-3-Aktivität mittels Western-Blot-Analyse

RLE-6TN-Zellen wurden für 8 h mit 10 µg/cm² ufCB behandelt. Eine Probe wurde zusätzlich für 1 h mit 50 µM Caspase-3-Inhibitor vorbehandelt, eine Probe nur mit 100 nM Staurosporin behandelt. (A) Fluoreszenzsignale des Western-Blots. Die 35 kDa-Bande entspricht der ungespaltenen Procaspase, die 19-kDa Bande repräsentiert die aktive Caspase-3. Erk1/2 (Extrazellulär regulierte Kinase) dient als Ladekontrolle. (B) Densitometrische Auswertung der Signalstärken der Banden. Für die Belastung mit ufCB wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt (Säule 1 und 2). Die Säulen 3 und 4 zu den Experimenten mit Staurosporin bzw. dem Caspase-3-Inhibitor repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten.

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, † signifikant unterschiedlich zu ufCB, p ≤ 0,05

Die quantitative Auswertung der Bandenintensität (Abb. 8B) zeigt, dass durch ufCB ein signifikanter Anstieg der Caspase-3-Aktivität induziert wurde, der um den Faktor 2,7 höher als die Kontrolle liegt. Die Vorbehandlung mit dem Caspase-3-Inhibitor reduzierte die Aktivität der Caspase signifikant. Als Positivkontrolle zur Induktion der Apoptose wurde der Protein-Kinase-C δ -Inhibitor Staurosporin verwendet. Die Staurosporin-induzierte Caspase-3-Aktivität war deutlich stärker als bei der mit ufCB behandelten Probe.

Um zu testen, in welchem Maß Partikel mit anderen Oberflächeneigenschaften, aber gleicher Größe bzw. mit gleichen Oberflächeneigenschaften, aber unterschiedlicher Größe die Apoptose induzieren können, wurden RLE-Zellen für 8 h mit 1, 5 und 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB, amorphem Silica (SiO_2) oder feinem Carbon Black (CB; Huber 990) belastet. Hierbei zeigte sich, dass beide ultrafeinen Partikel, ufCB und SiO_2 , die Caspase-3 dosisabhängig aktivieren (Abb. 9).

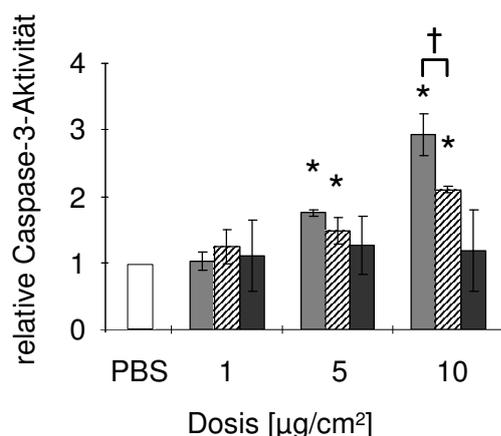


Abbildung 9: Einfluss von Partikeleigenschaften auf die Caspase-3-Aktivität

RLE-6TN-Zellen wurden für 8 h mit 1, 5 und 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB (graue Säulen), SiO_2 (gestrichelt) oder CB (schwarz) belastet und die Apoptose mit Hilfe eines Caspase-3-Aktivitäts-Tests untersucht. Die weiße Säule repräsentiert die mit PBS behandelte Kontrolle.

* signifikanter Anstieg zur Kontrolle, † signifikant unterschiedlich zu SiO_2 nach der Belastung mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, $p \leq 0,05$

5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB und SiO_2 induzieren einen signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Die Belastung mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB aktivierte die Caspase um das dreifache im Vergleich zur Kontrolle, die gleiche Dosis SiO_2 führte nur zu einem 2,2-fachen Anstieg. Ein Vergleich der Caspase-Aktivitäten nach der Belastung mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ belegt, dass ufCB zu einer signifikant höheren Apoptoserate führte als SiO_2 . Im Gegensatz zu den ultrafeinen Partikeln führte die Belastung mit CB nicht zur signifikanten Veränderung der Caspase-3-Aktivität.

3.2 Partikel-induzierte Proliferation

Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass verschiedene ultrafeine Partikel die Zell-Proliferation induzieren können (Friemann *et al.*, 1999; Nikula, 2000; Tamaoki *et al.*, 2004). Timblin und Mitarbeiter (2002) sprechen in diesem Zusammenhang von einer Kompensation der Partikel-induzierten Apoptose. Es sollte nun untersucht werden, ob ufCB die Proliferationsrate in RLE-6TN-Zellen erhöht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen bis zu 48 h mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet und der Einbau des Thymidin-Analogons BrdU in die DNS gemessen.

UfCB induziert die Zell-Proliferation in RLE-Zellen (Abb. 10). Nach 24-stündiger Belastung war ein signifikanter Anstieg (1,6-fach) der Partikel-induzierten DNS-Neusynthese im Vergleich zur Kontrolle messbar.

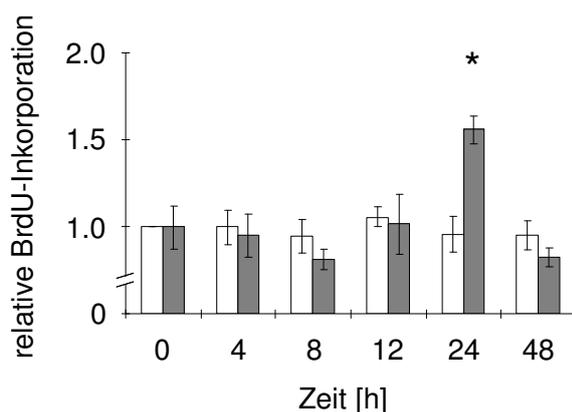


Abbildung 10: Induktion der BrdU-Inkorporation durch ufCB

Als Maß für die Proliferation wurde der relative BrdU-Einbau in die DNS bestimmt. Weiße Säulen repräsentieren die PBS-behandelten Kontrollen, graue Säulen die mit ufCB belasteten Proben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$

Als zweiter, unabhängiger Assay zum Nachweis der Proliferation wurde die Expression von „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) untersucht. PCNA wird in der späten G_1 und der S-Phase des Zellzyklus synthetisiert und ist daher ein Marker für DNS-Neusynthese (Griffey *et al.*, 1999).

In Abbildung 11A ist eine repräsentative Western-Blot-Analyse für PCNA dargestellt. Die Zellen wurden für 0, 24 und 48 h mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet und die Zellextrakte mit einer 10%igen SDS-Page aufgetrennt. Um sicher zu stellen, dass in allen Spuren gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle verwendet. Die densitometrische Auswertung von vier voneinander unabhängigen Experimenten ist im Diagramm in

Abbildung 11B dargestellt. Wie zuvor in Abbildung 10 beobachtet, war auch hier nach 24 h Belastung mit ufCB ein signifikanter Anstieg der Proliferation zu messen. Mit Hilfe der PCNA-Versuche konnten also die BrdU-Ergebnisse validiert werden.

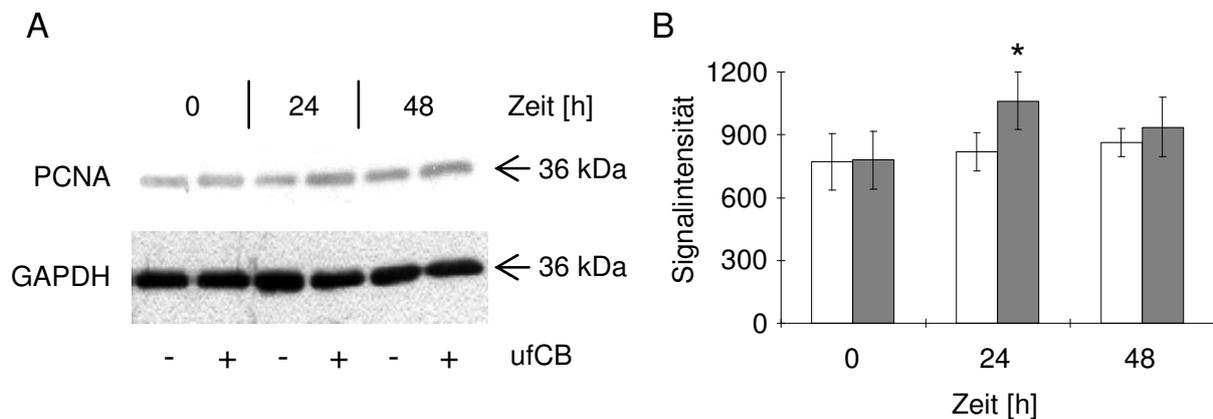


Abbildung 11: Nachweis der Proliferation durch PCNA-Expression

RLE-6TN-Zellen wurden für 0, 24 und 48 h mit 10 µg/cm² ufCB behandelt. (A) Fluoreszenzsignale des Western-Blots. Die 36-kDa Bande entspricht PCNA. GAPDH dient als Ladekontrolle. (B) Densitometrische Auswertung der Signalstärken der Bandenintensitäten aus vier unabhängigen Experimenten. Weiße Säulen repräsentieren die PBS-behandelten Kontrollen, graue Säulen die mit ufCB belasteten Proben.

* signifikante Erhöhung in Vergleich zur Kontrolle, p ≤ 0,05

Der Einfluss der chemischen Zusammensetzung und der Partikelgröße wurde nun auch für den Endpunkt Proliferation mit Hilfe des BrdU-Einbaus in die DNS untersucht. Die Belastung der Zellen erfolgte für 24 h mit 1, 5 und 10 µg/cm² ufCB, SiO₂ und CB.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, induzierten beide ultrafeinen Partikel (ufCB und SiO₂) die DNS-Neusynthese in RLE-Zellen. Der Belastung mit ufCB folgte ein dosisabhängiger Anstieg der Proliferation. Schon 1 µg/cm² führte zu einer signifikanten Erhöhung, bei 5 µg/cm² war eine 1,4-fache Induktion der Proliferation und bei 10 µg/cm² eine 1,6-fache Induktion zu beobachten. Auch die Silica-induzierte Proliferation in RLE-Zellen war dosisabhängig. Eine 24-stündige Belastung mit 5 µg/cm² SiO₂ führte zu einer signifikanten Erhöhung der DNS-Neusynthese, die bei 10 µg/cm² das 1,8-fache der Kontrolle aufwies. Das Molekulargewicht von SiO₂ ist

fünfmal so groß wie das von ufCB. Für den Versuch wurden die Zellen mit gleichen Massen belastet, d.h. es befanden sich fünfmal weniger SiO₂-Partikel auf den Zellen als ufCB-Partikel. Offensichtlich ist die chemische Zusammensetzung von Silica verantwortlich für die signifikante Erhöhung der Proliferation im Vergleich zu ufCB nach der Belastung mit 10 µg/cm².

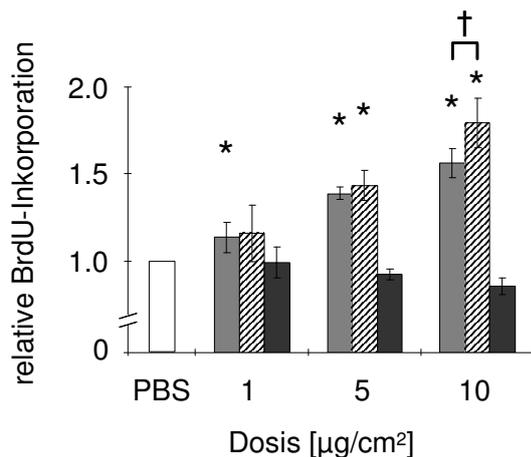


Abbildung 12: Einfluss von Partikeleigenschaften auf die BrdU-Inkorporation

RLE-6TN-Zellen wurden für 24 h mit 1, 5 und 10 µg/cm² ufCB (graue Säulen), SiO₂ (gestrichelt) oder CB (schwarz) belastet. Die weiße Säule repräsentiert die PBS-behandelte Kontrolle.

* signifikanter Anstieg zur Kontrolle, † signifikant unterschiedlich zu ufCB nach der Belastung mit 10 µg/cm², p ≤ 0,05

Im Gegensatz zu den ultrafeinen Partikeln führte die Belastung mit dem feinen Kohlenstoffpartikel (CB) nicht zu einer Zunahme der Proliferation (Abb. 12). Tendenziell ist sogar eine Verringerung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Das bedeutet, dass die Proliferation sowohl von der Größe als auch von der chemischen Zusammensetzung der Partikel abhängig ist.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nicht durch Partikel-induzierte Zytotoxizität (Nekrose) vermittelt wurden, sollte die Vitalität der Zellen überprüft werden. Eine messbare Größe zur Bestimmung der Vitalität ist die Freisetzung des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH), das nach dem Verlust der Membranintegrität aus dem Zytoplasma freigesetzt wird. Je stärker die Zellen geschädigt sind, desto mehr Enzym wird ins Zellkulturmedium ausgeschüttet.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Als Positivkontrolle wurden mit dem Zellmembran-zersetzenden Detergenz Triton X-100 behandelte Zellen verwendet. Die Vitalität dieser Proben entsprach 0%.

Tabelle 5: Einfluss der Partikel auf die Vitalität* von RLE-6TN Zellen

Partikel	Zeit		Dosis [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]						
			0	1	5	10	20	40	
ufCB	4	MW	95,1	94,5	95,7	94,9	95,0	94,9	
		Stabw	1,1	1,2	2,6	0,9	3,1	3,5	
SiO ₂		MW	95,4	94,6	95,0	95,8	93,4	94,5	
		Stabw	1,1	1,0	2,0	1,4	2,8	0,1	
CB		MW	95,1	94,5	94,8	94,3	93,9	94,8	
		Stabw	1,4	1,5	1,5	1,9	1,6	1,7	
ufCB		8	MW	95,7	95,9	95,6	93,4	93,2	91,2
			Stabw	4,4	4,3	3,5	3,6	2,7	3,4
SiO ₂	MW		95,0	94,4	94,1	93,2	93,2	93,0	
	Stabw		1,2	1,0	3,0	2,5	1,0	0,5	
CB	MW		94,9	96,0	94,1	93,6	93,4	94,3	
	Stabw		1,5	3,5	1,9	3,8	1,9	2,2	
ufCB	12		MW	94,9	93,8	93,3	93,8	90,5	89,1
			Stabw	2,6	0,9	2,0	1,8	2,4	2,1
SiO ₂		MW	94,9	94,0	91,9	90,9	88,9	86,3	
		Stabw	3,9	1,5	2,2	2,6	2,1	1,7	
CB		MW	93,8	94,1	94,5	93,5	92,6	94,6	
		Stabw	1,2	2,0	2,1	1,4	4,3	4,6	
ufCB		24	MW	92,6	93,4	91,1	89,8	84,9 [†]	85,0 [†]
			Stabw	0,5	4,2	3,8	2,2	7,7	2,7
SiO ₂	MW		93,0	93,0	92,3	88,5	82,9 [†]	80,6 [†]	
	Stabw		1,8	2,0	2,6	1,9	5,0	3,2	
CB	MW		94,2	93,8	93,4	93,1	91,1	88,8	
	Stabw		2,4	1,2	2,0	1,8	2,5	4,3	
ufCB	48		MW	90,8	90,1	88,3	86,2	77,6 [†]	71,8 [†]
			Stabw	3,1	1,5	2,6	3,0	4,7	6,3
SiO ₂		MW	90,6	87,6	85,5	81,4 [†]	73,3 [†]	66,2 [†]	
		Stabw	2,6	2,0	1,2	0,6	3,0	2,3	
CB		MW	90,6	90,0	89,1	87,6	86,3	84,4 [†]	
		Stabw	1,6	2,4	3,8	5,1	2,4	2,9	

* Zytotoxizität \leq 90%; [†] signifikante Abnahme im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle, $p \leq 0,05$

Die Belastung mit jedem der drei Partikeltypen führte zu einer Dosis- und Zeit-abhängigen Abnahme der Vitalität. Bis zu einer Dauer von 12 h Belastung nahm die Vitalität der Zellen im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle nicht signifikant ab. Tendenziell war die LDH-Ausschüttung bei den ultrafeinen Partikeln aber stärker als bei CB. Die 24-stündige Belastung der Zellen mit ufCB und SiO₂ führte bei den hohen Konzentrationen (20 bzw. 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) zu einem signifikanten Anstieg in der

LDH-Freisetzung, wohingegen die niedrigen Partikelkonzentrationen keinen Effekt hatten. Für CB wurde dieser Effekt nicht beobachtet, auch nach 24 h Belastung war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle zu beobachten. Die stärkste LDH-Freisetzung wurde für alle drei Partikeltypen nach 48 h gemessen. Bei der Belastung mit SiO₂ reichten schon 10 bzw. 20 µg/cm² aus, um die Vitalität im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu verringern. Die Belastung mit 40 µg/cm² SiO₂ reduzierte die Vitalität um 34%. UfCB zeigte einen ähnlich starken Effekt wie SiO₂. Die Belastung mit 20 µg/cm² führte zu einer signifikanten Abnahme im Vergleich zur Null-Stundenkontrolle (auf 77%). Eine 48 h Inkubation mit CB (40 µg/cm²) reduzierte die Vitalität ebenfalls signifikant. Die Freisetzung der LDH nahm auch in den unbelasteten Proben mit der Zeit zu. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Inkubation der Zellen im Hungermedium zurückzuführen. Da in allen Versuchen zur Apoptose und Proliferation mit einer maximalen Partikelkonzentration von 10 µg/cm² gearbeitet wurde, liefern die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Vitalität der Zellen die Erkenntnis, dass eine Partikel-induzierte Apoptose bzw. Proliferation nicht auf zytotoxische Effekte zurückzuführen ist.

3.3 Ist die Partikel-induzierte Proliferation eine Kompensation der Apoptose?

Die Induktion der Proliferation in Ratten-Pleura-Mesothel-Zellen nach der Belastung mit Asbest wird als kompensatorischer Effekt einer vorher verlaufenen Apoptose beschrieben (Goldberg *et al.*, 1997; Buder-Hoffmann *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 2003). Für ultrafeine Partikel ist bisher nicht bekannt, ob die Proliferation eine Kompensation des apoptotischen Zelltodes ist oder ob es sich dabei um zwei voneinander unabhängig regulierte Prozesse handelt.

Zur Überprüfung dieser Thesen wurden RLE-Zellen ausgesät und für 1 h mit einem zellpermeablen Caspase-3-Inhibitor (CPP32; DEVD-CHO; BD Biosciences, San Diego, CA) vorbehandelt. Außerdem wurden die Zellen mit dem Apoptose-induzierenden Agens Staurosporin behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h zusätzlich mit 10 µg/cm² ufCB belastet und die Proliferation mit Hilfe des BrdU-Einbaus gemessen. Wenn die Partikel-induzierte Proliferation nur eine Kompensation der Apoptose ist, dann müsste die Vorbehandlung mit dem Caspase-Inhibitor die

Proliferation reduzieren. Im Gegensatz dazu sollte Staurosporin auch in der PBS-Kontrolle eine kompensatorische Proliferation zur Folge haben.

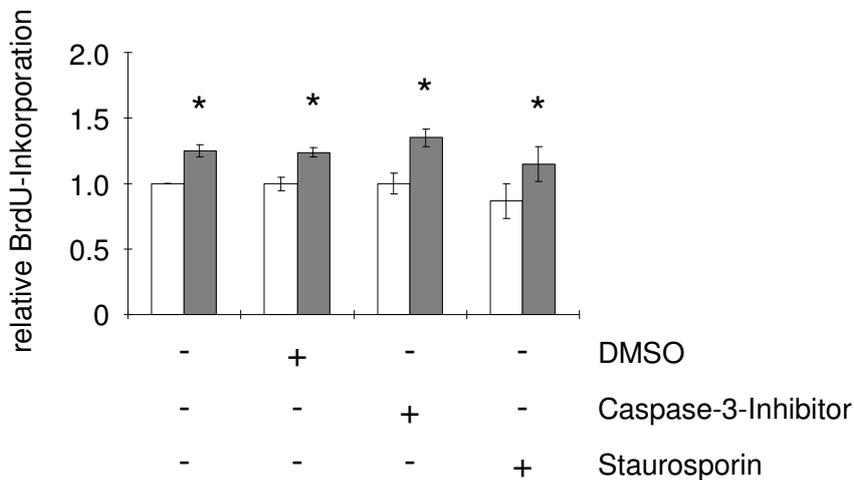


Abbildung 13: Wirkung von Apoptose-Inhibitor und -Induktor auf die Proliferation

Die Zellen wurden für 24 h mit PBS (weiße Säulen) oder 10 µg/cm² ufCB (graue Säulen) behandelt. Zwei Proben wurden zusätzlich für 1 h mit 50 µM Caspase-3-Inhibitor vorbehandelt, zwei Proben mit 10 nM Staurosporin.

* signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$

Das Experiment zeigt, dass die Proliferation trotz der Anwesenheit des Caspase-3-Inhibitors weiterhin durch ufCB induziert werden kann (Abb. 13). Dabei wurde die Proliferation auch durch Vorbehandlung mit einer Inhibitorkonzentration, welche die Partikel-induzierte Apoptose blockiert (50 µM; vgl. Abb. 7 und 9), nicht beeinflusst. Auch die Induktion der Apoptose durch 10 nM Staurosporin, eine Konzentration, die zu vergleichbaren Effekten wie 10 µg/cm² ufCB führte, induzierte keine kompensatorische Proliferation. Die mit Staurosporin behandelte PBS-Kontrolle hätte sonst eine mit ufCB vergleichbare Proliferation aufweisen müssen.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die durch ufP-induzierte Apoptose und Proliferation in RLE-Zellen zwei unabhängige Prozesse sind.

3.4 Beteiligung von Zelloberflächen-Rezeptoren

Die Kommunikation zwischen den Zellen ist eine erforderliche Voraussetzung für die Regulation komplexer biologischer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung oder Zelltod. Damit ein extrazellulärer Stimulus eine Reaktion in der Zelle auslösen kann, muss sein Signal von Zelloberflächenrezeptoren ins Zellinnere weitergeleitet werden. Diese Rezeptoren stellen mögliche Zielstrukturen für eine Partikel-Zell-Interaktion dar (Hackel *et al.*, 1999; Eliceiri, 2001).

3.4.1 „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGF-R)

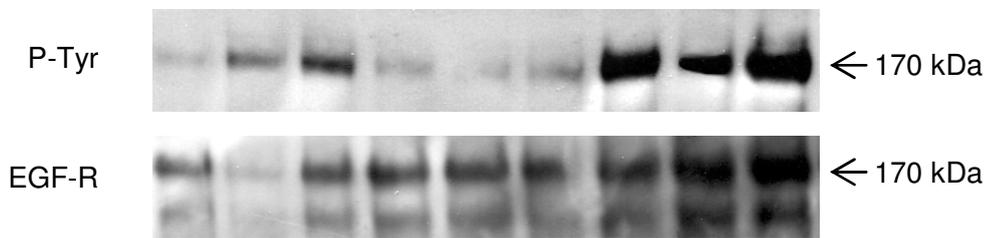
Verschiedene Partikel-induzierte Signalwege sind von dem zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehörenden EGF-R abhängig. Die Weiterleitung eines Signals erfordert die Phosphorylierung des Rezeptors. Mittels Immunpräzipitationsexperimenten wurde zunächst die ufCB-induzierte Aktivierung des EGF-R überprüft. Dazu wurde der Rezeptor mit Hilfe eines EGF-R Antikörpers präzipitiert. Nach Auftrennung in einem 7,5%igen SDS-Gel konnte mittels eines Phosphotyrosin-Antikörpers (P-Tyr-100) eine Bande bei 170 kDa detektiert werden (Abb. 14A). Dass es sich bei dieser Bande um den Tyrosin-phosphorylierten Rezeptor handelt, wurde durch die anschließende Untersuchung mit einem Antikörper gegen total-EGF-R bewiesen. Auch hier wurde eine Bande bei 170 kDa detektiert.

Die Belastung mit ufCB bewirkte eine Aktivierung des Rezeptors mit zwei Maxima (Abb. 14B). Nach einer frühen Rezeptoraktivierung 2 min nach Partikelbelastung ging die relative Phosphorylierung des Rezeptors nach 15 min bis auf den Kontrollwert zurück.

2 h nach der Partikelzugabe war der Rezeptor wieder dreimal so stark wie die Kontrolle phosphoryliert. Diese signifikante Zunahme der Phosphorylierung konnte auch bis zum Ende des Versuchs nach 8 h gemessen werden. Die für 15 min mit 100 ng/ml EGF behandelte Positivkontrolle ergab nur eine schwache Bande. Der Vergleich mit dem total-EGF-R Blot aber zeigt, dass in der Spur mit der EGF-behandelten Probe auch geringere Mengen des Rezeptors präzipitiert wurden. Generell wurden zu späteren Zeitpunkten größere Mengen EGF-R präzipitiert.

A

EGF-R Immunpräzipitation



B

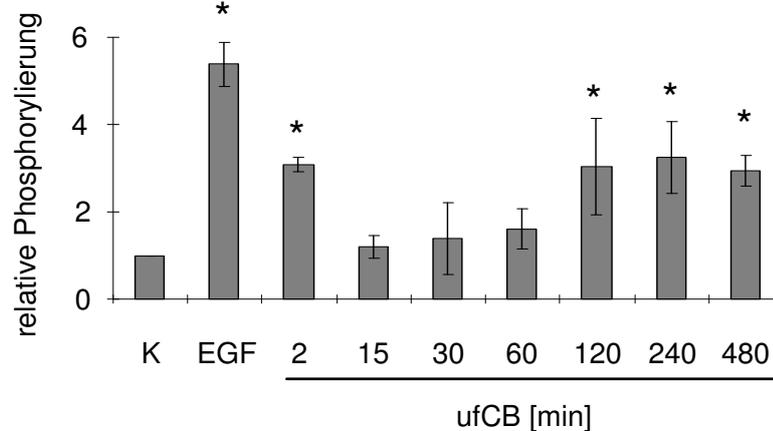


Abbildung 14: Phosphorylierungszustand des EGF-R nach Behandlung mit ufCB

RLE-6TN Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet. Die Positivkontrolle wurde für 15 min mit 100 ng/ml EGF behandelt. Für die Immunpräzipitation wurden 500 μg Proteinextrakt und 4 μg EGF-R-Antikörper eingesetzt. (A) Im Western-Blot wurde die Tyrosin-Phosphorylierung mit Hilfe eines Phospho-Tyrosin Antikörpers (P-Tyr-100) nachgewiesen. Nach dem Entfernen der Antikörper von der Membran erfolgte die Analyse auf total-EGF-R. (B) Densitometrische Auswertung der Bandenintensität. Die Bandenintensität von Phospho-Tyrosin wurde in Relation zu Gesamt-EGF-R gesetzt.

* signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$

Für die Behandlung mit Asbestfasern ist eine Beteiligung des Rezeptors sowohl an der Apoptose als auch an der Proliferation beschrieben (Zanella *et al.*, 1996; Faux *et al.*, 2001; Scapoli *et al.*, 2004). Um eine mögliche Beteiligung des EGF-R an der durch ufCB-induzierten Apoptose und Proliferation zu untersuchen, wurden die Zellen für 1 h mit Tyrphostin AG 1478, einem spezifischen Inhibitor der Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-R, vorbehandelt. Anschließend folgte eine Belastung mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB. Als Untersuchungszeitpunkte wurden die Maximalwerte der in Abbildung 6 und 10 dargestellten ufCB-induzierten Apoptose bzw. Proliferation gewählt.

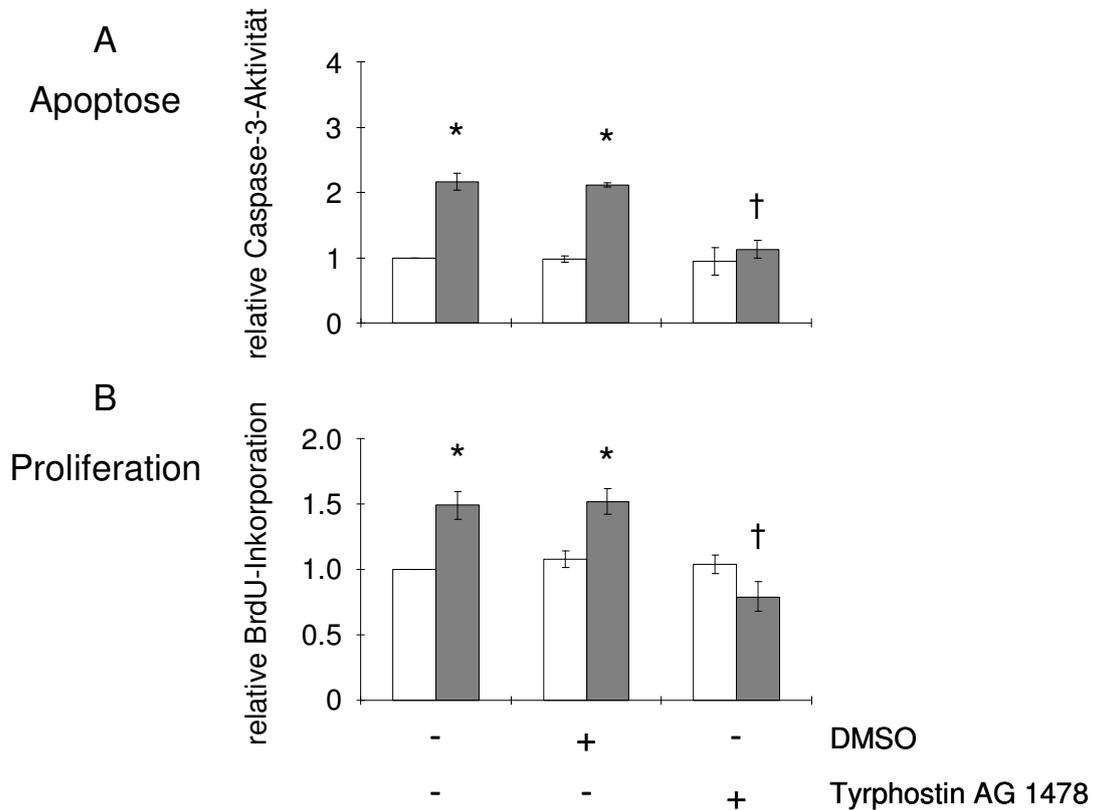


Abbildung 15: Wirkung eines EGF-Rezeptor-Inhibitors auf die Partikel-induzierte Apoptose bzw. Proliferation

RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M Tyrphostin AG 1478 vorbehandelt und dann für 8 bzw. 24 h mit 10 μ g/cm² ufCB belastet. Die Caspase-3-Aktivität diente als Maß für die Apoptose (A), die Proliferationsrate wurde über den Einbau von BrdU bestimmt (B). Weiße Säulen repräsentieren die unbehandelten Kontrollen, graue Säulen die mit ufCB belasteten Proben

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, $p \leq 0,05$

Tyrphostin AG 1478 verringerte die Partikel-induzierte Apoptose signifikant bis auf das Kontrollniveau (Abb. 15A). Die Lösungsmittelkontrolle wurde nicht durch AG 1478 verändert. In Abbildung 15B ist gezeigt, dass auch die Proliferation durch den Inhibitor signifikant reduziert wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Tamaoki (2004) überein, der eine Beteiligung des EGF-R an der ufCB-induzierten Proliferation in menschlichen Bronchial-Epithelzellen nachweisen konnte.

Die Inhibitionsversuche mit Tyrphostin AG 1478 konnten zeigen, dass die Phosphorylierung des EGF-R einen notwendigen Schritt in der Partikel-induzierten Signaltransduktion in RLE-Zellen, sowohl für die Apoptose als auch für die Proliferation, darstellt.

3.4.2 Beteiligung von β_1 -Integrin

Integrine sind Transmembran-Rezeptoren mit denen die Zelle an die Extrazelluläre Matrix (EZM) bindet. Mittels Inhibitionsstudien konnte gezeigt werden, dass Integrine an der Regulation der Apoptose (Wary *et al.*, 1996; Reginato *et al.*, 2003) und Proliferation (Mizejewski, 1999; Schwartz & Assoian, 2001; Hapke *et al.*, 2003) beteiligt sind. Nun sollte die Beteiligung der Integrine an den Signalwegen der Partikel-induzierten Endpunkte Apoptose und Proliferation untersucht werden.

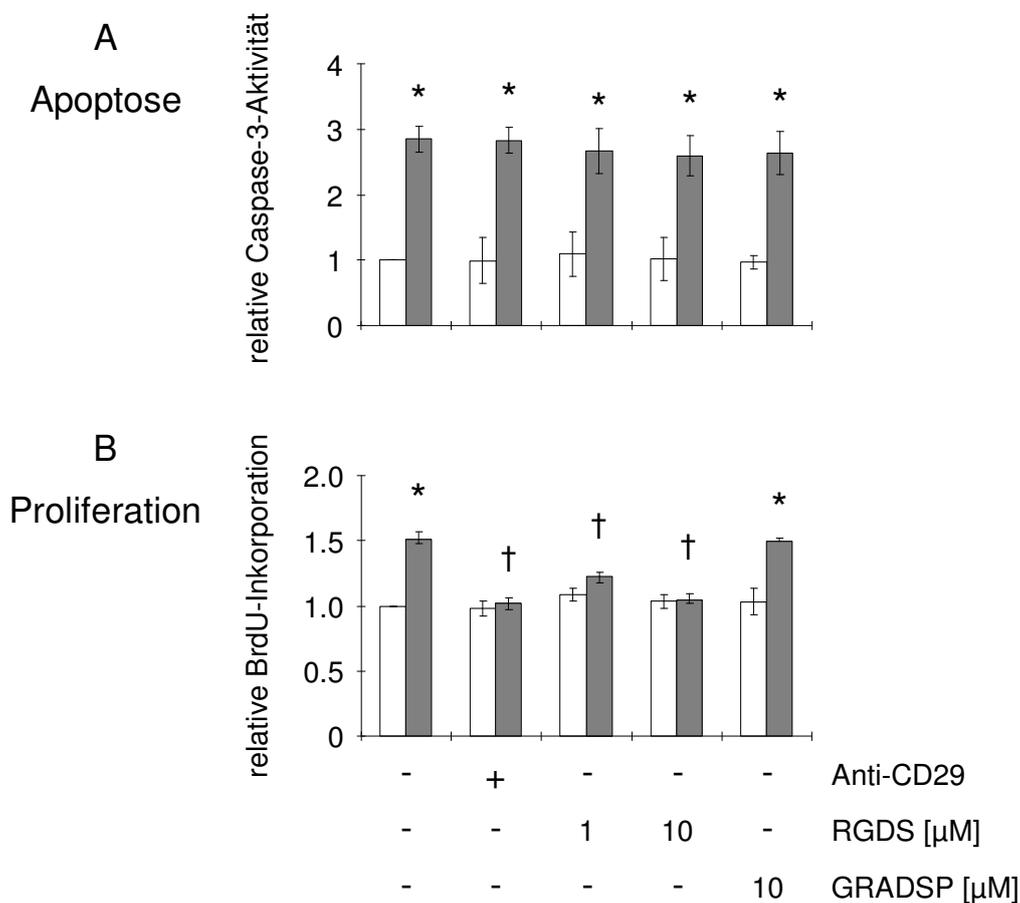


Abbildung 16: Beteiligung der Integrine an der ufCB-induzierten Apoptose bzw. Proliferation

RLE-6TN-Zellen wurden für 1 h mit 2,5 μ g/ml anti-CD29, 1 bzw. 10 μ M RGDS oder 10 μ M GRADSP (Kontrollpeptid) vorbehandelt und dann für 8 (Apoptose) bzw. 24 h (Proliferation) mit 10 μ g/cm² ufCB belastet. Als Maß für Apoptose wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt, die Proliferationsrate wurde über den Einbau von BrdU gemessen. Weiße Säulen repräsentieren die unbehandelten Kontrollen, graue Säulen die mit ufCB belasteten Proben

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, $p \leq 0,05$

RLE-Zellen wurden für 1 h mit einem β 1-Integrin-inaktivierenden-Antikörper (anti-CD29), RGDS oder einem Kontrollpeptid vorbehandelt und anschließend für 8 bzw. 24 h mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet. Die Apoptoserate wurde über die Caspase-3-Aktivität, die Proliferation über den Einbau von BrdU gemessen.

Die für verschiedene Noxen und Zellsysteme anerkannten Integrin-Inhibitoren (Ben-Ze'ev, 1997; Eliceiri, 2001) zeigten keine Effekte auf die Partikel-induzierte Apoptose (Abb. 16A). Die Caspase-3-Aktivität war trotz der Vorbehandlung mit den Inhibitoren im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle weiterhin signifikant erhöht. Im Gegensatz zur Apoptose bewirkten beide Inhibitoren eine signifikante Abnahme der Partikel-induzierten Proliferation (Abb. 16B), die für RGDS dosisabhängig war. Das Kontrollpeptid zeigte keinen Einfluss.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die von ultrafeinen CB-Partikeln induzierte Proliferation über die Signalwege des EGF-R und β 1-Integrine vermittelt wird. Die Partikel-induzierte Apoptose hingegen zeigt lediglich eine Abhängigkeit von der Aktivierung des EGF-R.

3.5 Signalwege in der Zelle

Die Wachstumsfaktorrezeptor- bzw. Integrin-vermittelte Apoptose und Proliferation kann in der Zelle über verschiedene Signalwege aktiviert werden (Schwartz & Assoian, 2001). Es ist bekannt, dass die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Protein-Kinase B (PKB) und die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) Erk1/2 sowie Jnk1/2 (c-Jun-N-terminale Kinase) durch die Stimulation mit Partikeln phosphoryliert werden (Timblin *et al.*, 1998; Berken *et al.*, 2003; Tamaoki *et al.*, 2004). Um die Beteiligung dieser Kinasen bei der Partikel-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden RLE-Zellen mit spezifischen pharmakologischen Inhibitoren vorbehandelt. Folgende Inhibitoren wurden verwendet: Wortmannin und Ly 294002 für die PI3K, SH-5 für PKB, den Mek1/2 Inhibitor PD 98059, der für die spezifische Blockade von Erk1/2 akzeptiert ist (Alessi *et al.*, 1995) und ein Jnk-Inhibitor-Peptid sowie SP 600125 zur Untersuchung von Jnk1/2. Als Maß für die Apoptoserate wurde die Caspase-3-Aktivität nach 8 h Belastung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB bestimmt.

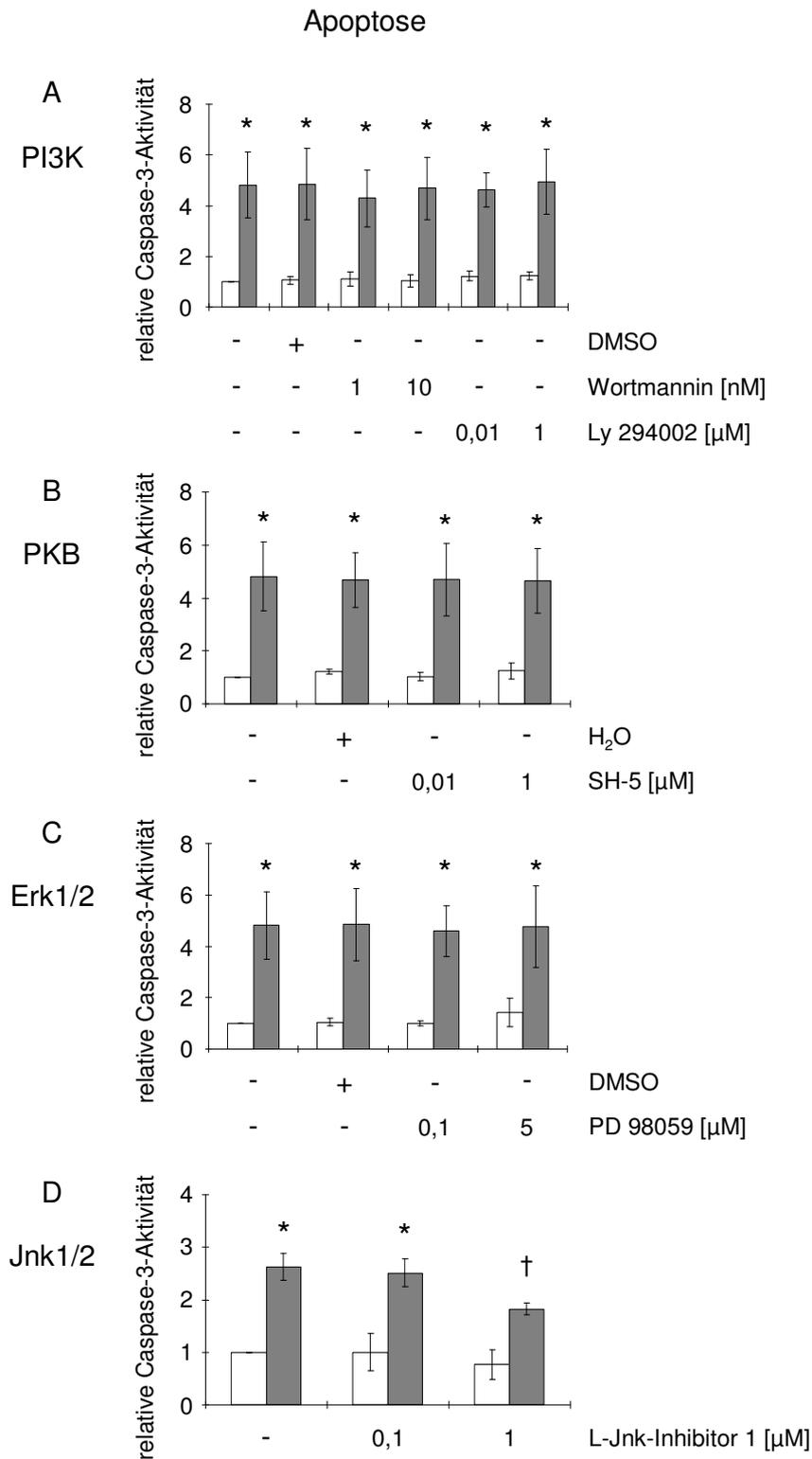


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Inhibitoren der Signalkaskade auf die Partikel-induzierte Apoptose

Die Zellen wurden für 1 h mit folgenden Inhibitoren vorbehandelt: Wortmannin, Ly 294002, SH-5, PD 98059 und L-Jnk-Inhibitor 1. Nach der 8-stündigen Belastung mit 10 μ g/cm² ufCB wurde die Apoptoserate mittels der Caspase-3-Aktivität bestimmt. Die Partikel-belasteten Proben sind als graue, die entsprechenden Kontrollen als weiße Säulen dargestellt.

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, p \leq 0,05

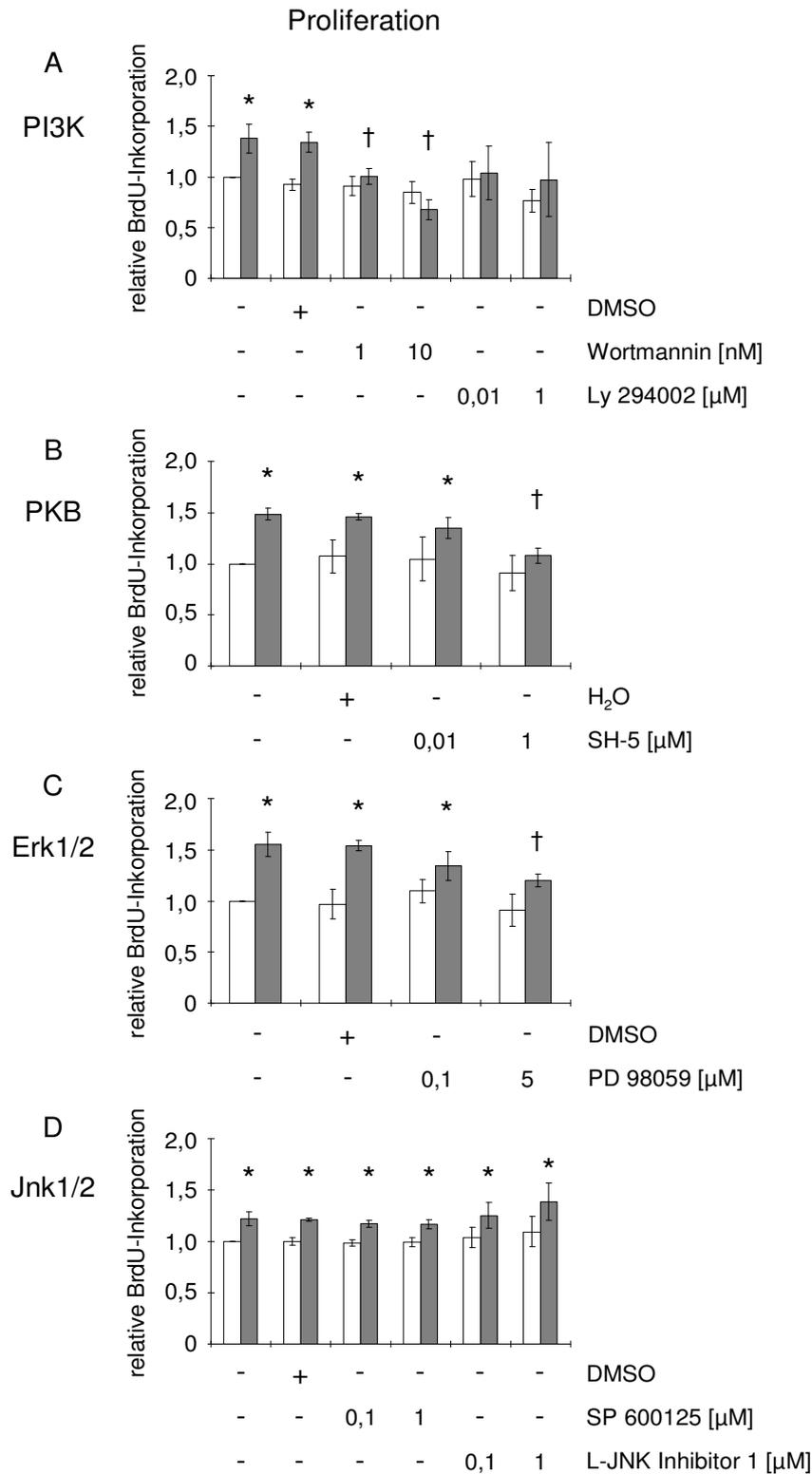


Abbildung 18: Einfluss verschiedener Inhibitoren der Signalkaskade auf die Partikel-induzierte Proliferation

Die Zellen wurden für 1 h mit folgenden Inhibitoren vorbehandelt: Wortmannin, Ly 294002, SH-5, PD 98059 und L-Jnk-Inhibitor 1. Nach der 24 h Belastung mit 10 μg/cm² ufCB wurde die Proliferation über den Einbau von BrdU in die neu synthetisierte DNS bestimmt. Die Partikel-belasteten Proben sind als graue, die entsprechenden Kontrollen als weiße Säulen dargestellt.

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, p ≤ 0,05

Die Inhibition von PI3K, PKB und Erk1/2 führte nicht zu einer signifikanten Abnahme der Caspase-Aktivität (Abb. 17A-C). Wie in Abbildung 17D zu sehen ist, reduzierte im Gegensatz dazu die Vorbehandlung der Zellen mit einem Jnk-blockierenden Peptid (L-Jnk-Inhibitor 1, 1 μ M) die Caspase-3-Aktivität signifikant (50%). Demzufolge sind die MAP-Kinasen Jnk1/2 offensichtlich an der ufCB-induzierten Apoptose beteiligt, PI3K, PKB und Erk1/2 aber nicht.

Im Folgenden wurde auch die Beteiligung der beschriebenen Kinasen an der ufCB-induzierten Proliferation untersucht. Beide verwendeten PI3K-Inhibitoren reduzierten den BrdU-Einbau in die DNS dosisabhängig (Abb. 18A). Dabei resultierte die Vorbehandlung mit Wortmannin in einer signifikant verminderten Proliferation. Auch der Gebrauch des PKB-Inhibitors SH-5 reduzierte die ufCB-induzierte DNS-Neusynthese (Abb. 18B). Allerdings führte nur die höhere Dosierung (1 μ M) zu einer signifikanten Abnahme (80%). Durch Vorbehandlung mit dem für die spezifische Blockade von Erk1/2 akzeptierten Mek1/2 Inhibitor PD 98059 (5 μ M) wurde die Proliferation auch signifikant um 60% reduziert (Abb. 18C). Demzufolge haben die PI3K, PKB und die MAP-Kinasen Erk1/2 einen Einfluss auf die Partikel-induzierte Proliferation. Dieses Ergebnis stimmt mit Studien von Tamaoki und Mitarbeitern (2004) überein, die eine Beteiligung der MAPK Erk1/2 an der ufCB-induzierten Proliferation untersucht haben. Beide verwendeten Jnk1/2-Inhibitoren besaßen keinen Einfluss auf die Partikel-induzierte Proliferation (Abb. 18D).

Mit Hilfe dieser Inhibitionsexperimente konnte gezeigt werden, dass die ufCB-induzierte Apoptose über Jnk1/2 vermittelt wird, während die ufCB-induzierte Proliferation über PI3K, PKB und Erk1/2 reguliert wird. Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde eine Aktivierung von Erk1/2 und Jnk1/2 mittels Western-Blot-Analyse auf der Ebene der Phosphorylierung nachgewiesen (3.6.3).

3.6 Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) als Mediatoren der Partikel-spezifischen Signaltransduktion

Viele Partikeltypen sind in der Lage, ROS zu generieren. Diese können Signalwege induzieren, die zu Apoptose bzw. Proliferation führen (Timblin *et al.*, 2002). Die Beteiligung von ROS an den Partikel-induzierten Endpunkten wurde mit verschiedenen Versuchsansätzen untersucht.

3.6.1 Einfluss von Partikeln auf den Oxidations-/Antioxidationsstatus der Zelle

Zellen wurden für 18 h mit 20 mM N-Acetyl-Cystein (NAC) vorbehandelt. Das Thiol NAC stimuliert die zelluläre Glutathionproduktion, kann aber auch direkt als Radikal-Fänger wirken (Sadowska *et al.*, 2006). Nach der anschließenden einstündigen Belastung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB wurden die Zellen mit Hilfe des in 2.6 beschriebenen Tests auf das Verhältnis von GSH/GSSG in der Zelle untersucht. Die Abnahme der reduzierten Form von Glutathion (GSH), einem intrazellulären Antioxidanz (Meister & Anderson, 1983), gilt als Indikator für die Entstehung von ROS (Halliwell & Gutteridge, 1984; MacNee *et al.*, 1997).

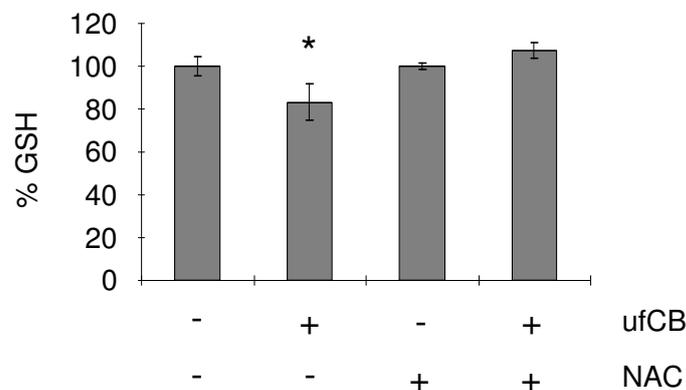


Abbildung 19: Einfluss von ufCB auf den Oxidationsstatus von Glutathion

RLE-Zellen wurden für 18 h mit 20 mM NAC vorbehandelt und anschließend für 1 h mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet. Die Messung beruht auf der enzymatischen Reduktion von GSSG.

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, $p \leq 0,05$

Die einstündige Belastung der Zellen mit ufCB resultierte in einem um 20% verringerten GSH-Pool (Abb. 19). Durch die Anwesenheit von NAC konnte die Oxidation von GSH zu GSSG verhindert werden. Diese Untersuchungen stimmen mit Ergebnissen von Stone (1998) in A549-Zellen (humane Lungenkarzinom-Zellen) überein. Eine Belastung mit ufCB führt demzufolge zur Veränderung des Oxidationsstatus der Zellen (Wilson *et al.*, 2002).

3.6.2 Einfluss von ROS auf die Apoptose bzw. die Proliferation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ROS durch ufCB generiert werden, sollte geklärt werden, ob sie auch einen Einfluss auf die Apoptose bzw. Proliferation haben. Hierzu wurden RLE-Zellen mit NAC (18 h) oder Diphenyleneiodonium (DPI; 1 h) vorbehandelt. Nach der Belastung mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB wurde die Caspase-3-Aktivität (8 h) bzw. der BrdU-Einbau in die DNS (24 h) untersucht. Wie schon in 3.6.1 beschrieben, ist NAC eine Vorstufe von reduziertem Glutathion. DPI ist ein NADPH-Oxidase-Inhibitor und besitzt keinen Einfluss auf Glutathion.

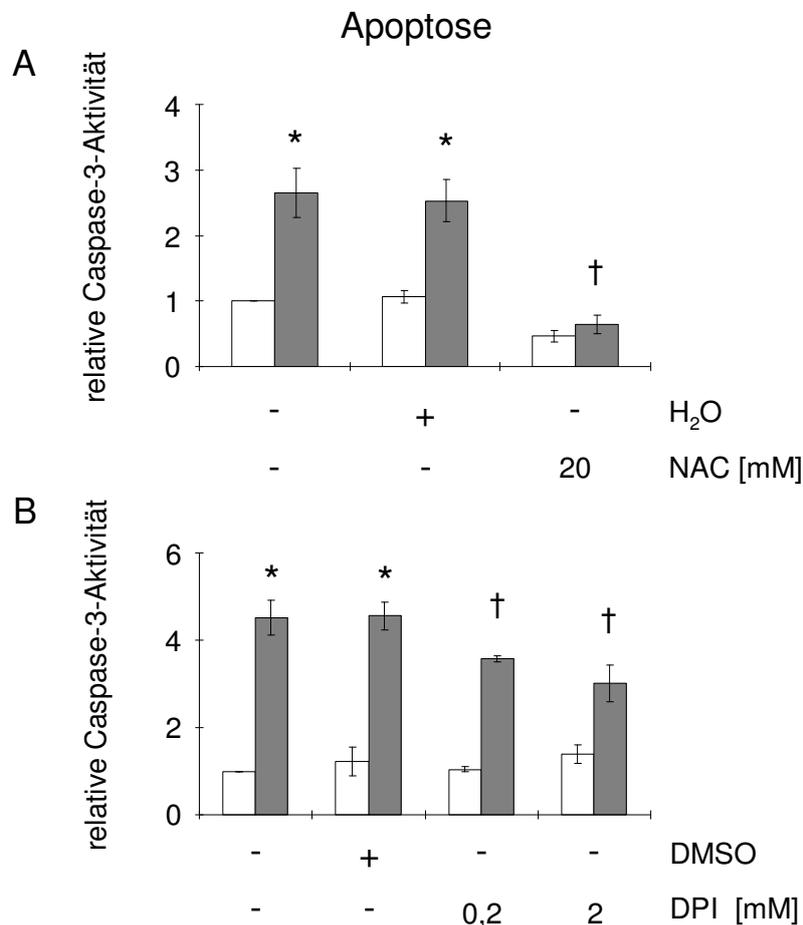


Abbildung 20: Einfluss von NAC (A) bzw. DPI (B) auf die ufCB-induzierte Apoptose

RLE-Zellen wurden für 18 h mit 20 mM NAC bzw. für 1 h mit DPI (0,2 und 2 mM) vorbehandelt und anschließend für 8 h mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet. Die relative, durch ufCB-induzierte Caspase-3-Aktivität (graue Säulen) wurden im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen bestimmt (weiße Säulen).

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, $p \leq 0,05$

Wie bereits bei Untersuchungen mit Silica oder DEP gezeigt wurde (Sarih *et al.*, 1993; Baulig *et al.*, 2003), reduzierte NAC die ufCB-induzierte Apoptose signifikant (Abb. 20A). Zusätzlich wurde durch die NAC-Vorbehandlung die Caspase-Aktivität der Kontrolle vermindert, was darauf schließen lässt, dass ROS auch an der nicht Partikel-vermittelten Apoptose beteiligt sind. Eine signifikante Abnahme der Caspase-3-Aktivität wurde auch nach der Vorbehandlung mit DPI beobachtet (Abb. 20B). Die Aktivität wurde bei einer DPI-Konzentration von 2 mM um 45%, bei 0,2 mM immer noch um 25% gehemmt. Diese Ergebnisse führen zu dem Hinweis, dass ROS die Apoptose in RLE-Zellen induzieren und eine Belastung mit ufCB zur Freisetzung von ROS über die NADPH-Oxidase führt.

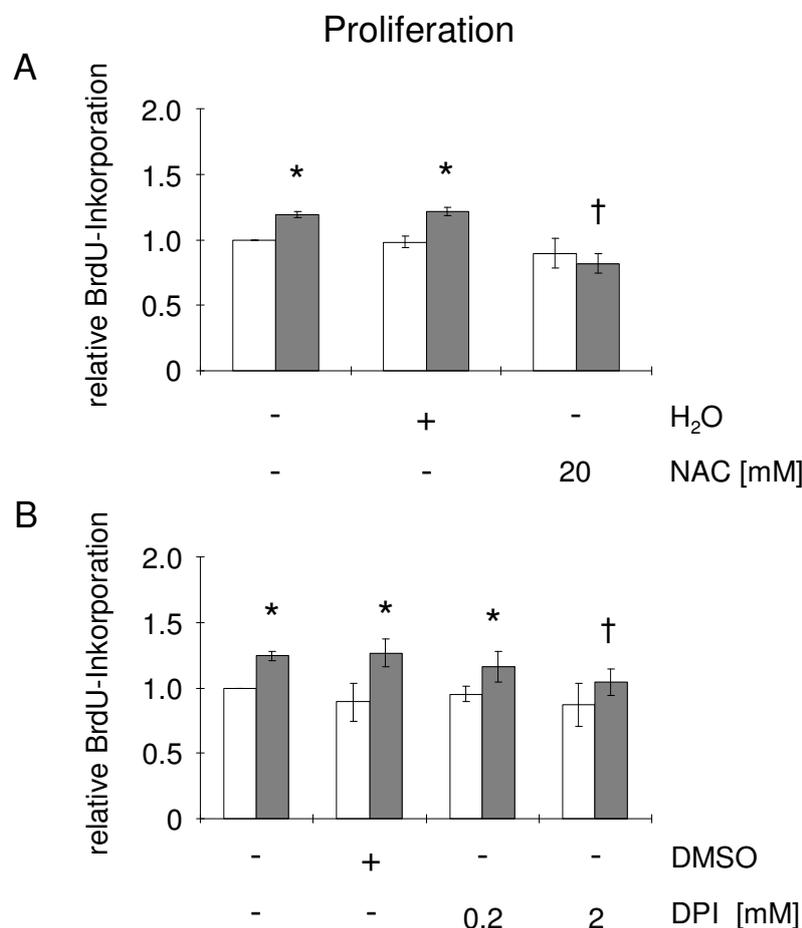


Abbildung 21: Einfluss von NAC (A) bzw. DPI (B) auf die ufCB-induzierte Proliferation

RLE-Zellen wurden für 18 h mit 20 mM NAC bzw. für 1 h mit DPI (2 und 0,2 mM) vorbehandelt und anschließend für 24 h mit 10 µg/cm² ufCB belastet. Die ufCB-induzierte DNS-Neusynthese (graue Säulen) wurde im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen (weiße Säulen) bestimmt.

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, p ≤ 0,05

ROS sind als Signalmoleküle an der Induktion der Proliferation in verschiedenen Zelltypen beteiligt (Chess *et al.*, 2005). Es zeigte sich, dass ROS auch für die ufCB-induzierte Proliferation in RLE-Zellen verantwortlich waren (Abb. 21). Neben NAC (A) führte auch DPI (B) zur signifikanten Abnahme der DNS-Neusynthese. Der BrdU-Einbau konnte durch die Präinkubation mit 20 mM NAC komplett, durch 2 mM DPI um 80% reduziert werden.

3.6.3 MAP-Kinase-Signalwege

Wie schon unter 3.5 beschrieben, sind die MAP-Kinasen an der ufCB-induzierten Apoptose (Jnk1/2) bzw. Proliferation (Erk1/2) beteiligt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch ufCB generierte ROS diese Kinasen aktivieren können. Dazu wurden RLE-Zellen wie unter 3.6.1 beschrieben behandelt, zu verschiedenen Zeitpunkten Proteinextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt und die Phosphorylierung der MAPK Jnk1/2 und Erk1/2 mittels phosphospezifischer Antikörper untersucht. Es ist bekannt, dass Partikel-induzierte ROS zu einer frühen Aktivierung der MAP-Kinasen führen können (Tamaoki *et al.*, 2004). Deswegen wurden zusätzlich zu den Zeitpunkten, an denen die maximale Apoptose bzw. Proliferation beobachtet wurde, auch frühe Zeitpunkte zwischen 2 und 15 min untersucht.

Nach der Belastung mit ufCB war eine zeitabhängige Phosphorylierung von Jnk1/2 und Erk1/2 zu beobachten (Abb. 22). Beide Kinasen wurden bereits früh nach 15 min (Jnk1/2) bzw. 2 min (Erk1/2) in den Partikel-belasteten Proben stärker aktiviert als in den entsprechenden PBS-behandelten Kontrollen. Die Jun-Kinasen Jnk1/2 wurden auch nach 4, 8 und 24 h Belastung stärker als die Kontrolle phosphoryliert, wobei die maximale Aktivierung nach 4 h gemessen wurde. Eine Vorbehandlung der Zellen mit NAC führte nach 4, 8 und 24 h zu einer reduzierten Phosphorylierung.

Im Gegensatz zu den Jun-Kinasen waren die MAP-Kinasen Erk1/2 zu jedem der untersuchten Zeitpunkte stärker als die Kontrolle phosphoryliert, die maximale Aktivierung wurde aber erst nach 8 h beobachtet. Eine Vorbehandlung mit NAC führte immer zu einer geringeren Phosphorylierung im Vergleich zu ufCB. NAC reduzierte die Phosphorylierung bei den frühen Werten (2, 8 und 15 min Belastung)

bis auf den Kontrollwert. Bei den späteren Zeitpunkten (4, 8 und 24 h) war keine 100-prozentige Reduktion der Phosphorylierung zu sehen.

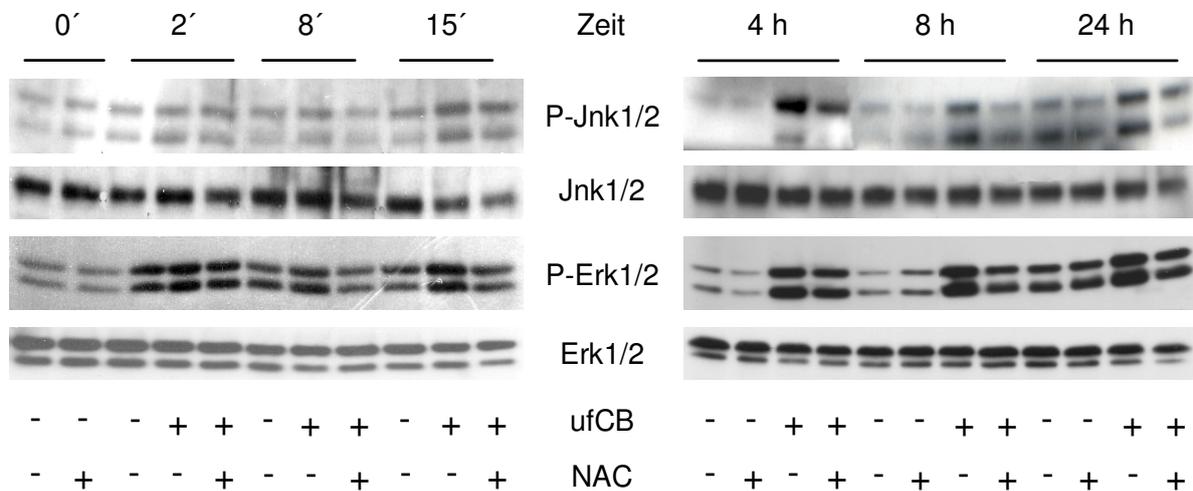


Abbildung 22: Effekt von NAC auf die ufCB-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen Jnk1/2 und Erk1/2

RLE-Zellen wurden nach der Vorbehandlung mit 20 mM NAC für 2, 8 und 15 min bzw. 4, 8 und 24 h mit 10 µg/cm² ufCB belastet und anschließend die Aktivierung der MAPK mit phosphospezifischen Antikörpern im Western-Blot überprüft. Als Ladekontrolle wurden Antikörper gegen total-Erk1/2 bzw. total-Jnk1/2 verwendet

3.6.4 Die Rolle von Kalzium als Mediator der ufCB-induzierten Apoptose

Es gibt Hinweise, dass die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration in verschiedenen Zellen Apoptose auslöst (Lang *et al.*, 2005). UfCB kann, durch eine Interaktion mit in der Zellmembran lokalisierten Kalziumkanälen, einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration verursachen. Dieser Partikel-induzierte Kalzium-Einstrom in die Zelle ist ROS-vermittelt (Stone *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2002). Kalzium ist auf der anderen Seite aber auch an der ROS-Entstehung über die Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase beteiligt (Raddassi *et al.*, 1994). Aus diesem Grund sollte die Rolle von Kalzium bei der ufCB-induzierten Apoptose in RLE-Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden 1 h mit Verapamil, einem Ca²⁺-Kanal-Blocker, vorbehandelt und anschließend für 8 h

mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe des Caspase-3-Aktivitäts-Tests bestimmt.

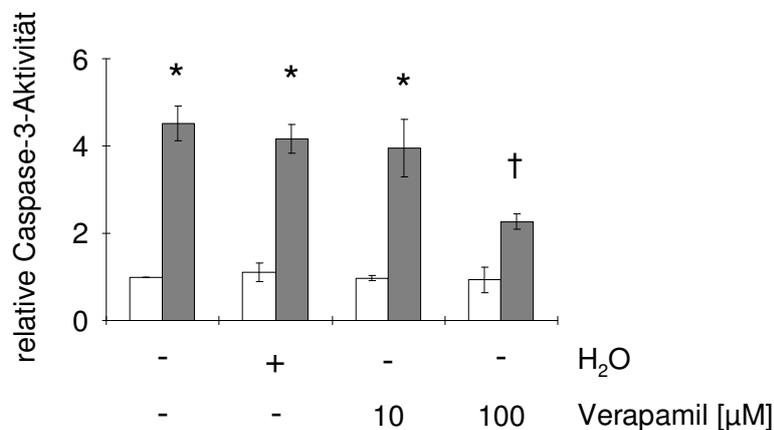


Abbildung 23: Wirkung des Ca²⁺-Kanal Blockers Verapamil auf die ufCB-induzierte Apoptose

Die Zellen wurden für 1 h mit 10 bzw. 100 μM Verapamil vorbehandelt. Nach 8-stündiger Belastung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB (graue Balken) wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt.

* signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle (weiße Balken), † signifikant verringert im Vergleich zur ufCB-behandelten Probe, $p \leq 0,05$

Die Partikel-induzierte Apoptose wurde durch die Vorbehandlung mit 100 μM Verapamil im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 65% reduziert (Abb. 23). Demzufolge ist Kalzium an der Partikel-induzierten Apoptose in RLE-Zellen beteiligt. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse aus den Abbildungen 19 bis 23 auf eine Beteiligung von ROS an den Partikel-induzierten Signalwegen zur Apoptose bzw. Proliferation hin. NAC verhinderte die Oxidation von Glutathion (GSH). Außerdem reduzierte es die Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und Jnk1/2 und verringerte die Partikel-induzierte Apoptose bzw. Proliferation signifikant. Der NADPH-Oxidase-Inhibitor DPI unterstreicht die Beteiligung von ROS. Er führte zur signifikanten Reduktion beider Endpunkte.

3.7 Über welche Signalwege wird die Partikel-induzierte Apoptose vermittelt?

Der Signalweg, über den die Partikel-induzierte Apoptose vermittelt ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Tierexperimentelle Studien von Piguet und Mitarbeitern (1993) sowie Borges und Mitarbeitern (2001) mit Silica weisen auf eine Todes-Rezeptor-vermittelte-Apoptose (Fas) unter Beteiligung von Caspase-8 hin. Studien von Thibodeau und Mitarbeitern (2004) lassen dagegen auf eine mitochondrial-gesteuerte Apoptose und die Ausschüttung von Cytochrom-c (Cyt-c) schließen.

Um Hinweise auf die Signalwege der ufCB-induzierten Apoptose (vgl. Abb. 6-9) zu erhalten, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proteinextrakte für die Western-Blot-Analyse präpariert. Eine Beteiligung von Cyt-c, Caspase-3, Caspase-8 und Caspase-9 an der ufP-induzierten Apoptose wurde mit spezifischen Antikörpern und Inhibitorversuchen untersucht.

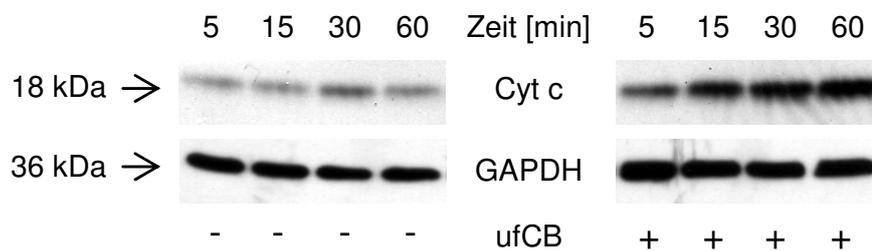


Abbildung 24: Ausschüttung von Cytochrom-c ins Zytoplasma der Zelle

RLE-Zellen wurden für 5, 15, 30 und 60 min mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet und anschließend die Ausschüttung von Cytochrom-c im Western-Blot überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Die Belastung mit ufCB führte zu einer zeitabhängigen Ausschüttung von Cyt-c ins Zytoplasma (Abb. 24). Bereits nach 5 min war ein Anstieg der Cyt-c-Ausschüttung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten, der über den untersuchten Zeitraum noch weiter zunahm.

Cyt-c bildet zusammen mit ATP, Apaf-1 und der Procaspase-9 das Apoptosom, welches die Aktivierung von Caspase-9 induziert. Die Aktivierung von Caspase-9 kann deshalb als Marker für den intrinsischen Weg der Apoptose betrachtet werden. Um zu überprüfen, ob ultrafeine Partikel auch Caspase-9 aktivieren, wurden RLE-

Zellen für 2, 4 und 6 h mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet. In Abbildung 25 ist eine repräsentative Western-Blot-Analyse für Caspase-9 dargestellt. Die Procaspase ist als kräftige Bande bei 51 kDa zu erkennen. Die beiden aktiven Spaltprodukte haben eine Größe von 40 bzw. 38 kDa.

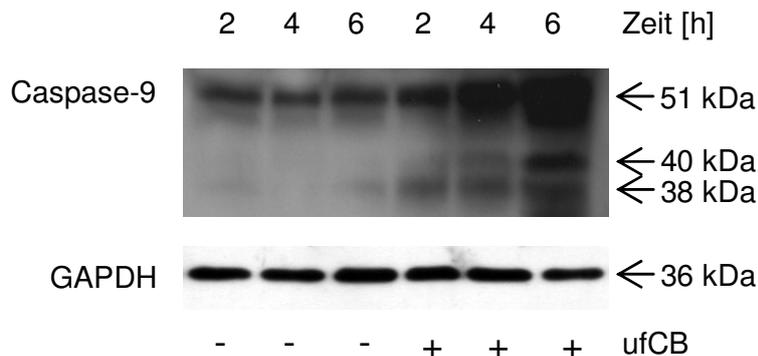


Abbildung 25: Nachweis der zeitabhängigen Aktivierung von Caspase-9 mittels Western-Blot-Analyse

RLE-Zellen wurden für 2, 4 und 6 h mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet. Die 51 kDa Bande entspricht der ungespaltenen Procaspase, die beiden 40 bzw. 38 kDa Banden repräsentieren die aktive Caspase-9. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Caspase-9 wurde durch die Belastung mit ufCB zeitabhängig aktiviert (Abb. 25). Bereits nach 2 h waren die charakteristischen Spaltprodukte zu beobachten. Dieses Signal nahm bis zum Ende des Versuchs nach 6 h weiter zu.

Die Caspase-9-vermittelte Aktivierung von Caspase-3 stellt den nächsten Schritt in der Caspase-Kaskade dar. Eine 8-stündige Belastung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB führte, wie schon in Abbildung 7 gezeigt, zu einem signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivität. In einem weiteren Versuch wurde auch die Zeitabhängigkeit der Caspase-3-Aktivierung untersucht. Dazu wurden RLE-Zellen für 4, 6 und 8 h mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ufCB belastet.

Die zeitabhängige Spaltung von Caspase-3 korrelierte mit der Ausschüttung von Cyt-c und der Caspase-9-Spaltung. Bereits 4 h nach der Belastung war das aktive, 19 kDa große Fragment detektierbar (Abb. 26). Die Bandenintensität nahm bis zur Belastung von 8 h weiter zu.

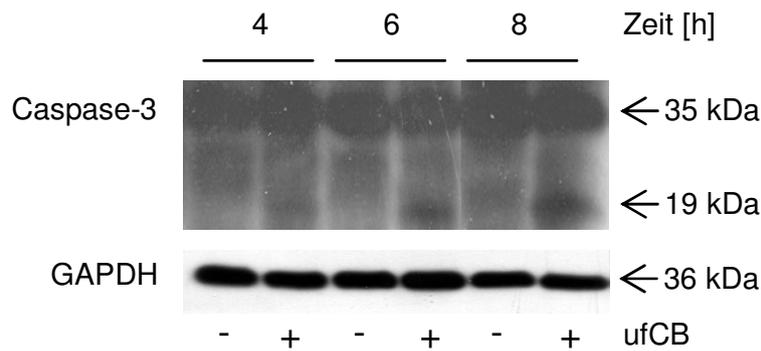


Abbildung 26: Nachweis der zeitabhängigen Aktivierung von Caspase-3 mittels Western-Blot-Analyse

RLE-Zellen wurden für 4, 6 und 8 h mit 10 µg/cm² ufcB belastet. Die 35 kDa Bande entspricht der ungespaltenen Procaspase, die 19 kDa Bande repräsentiert die aktive Caspase-3. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet

Die Ergebnisse aus den Abbildungen 24 bis 26 weisen auf eine mitochondrialgesteuerte Apoptose hin. Da aber auch die Rezeptor-vermittelte Apoptose zur Aktivierung von Caspase-3 führt, ist es möglich, dass die Partikel-induzierte Apoptose zusätzlich über Todes-Rezeptoren vermittelt wird. Um zu überprüfen, ob die Apoptose in RLE-Zellen auch über Fas vermittelt werden kann und ob ufP diesen Weg induzieren können, wurden die Zellen für 8 h mit 100 ng/ml Fas-Ligand behandelt. Zusätzlich wurde die Beteiligung der Caspase-8 mit Hilfe eines Inhibitors überprüft.

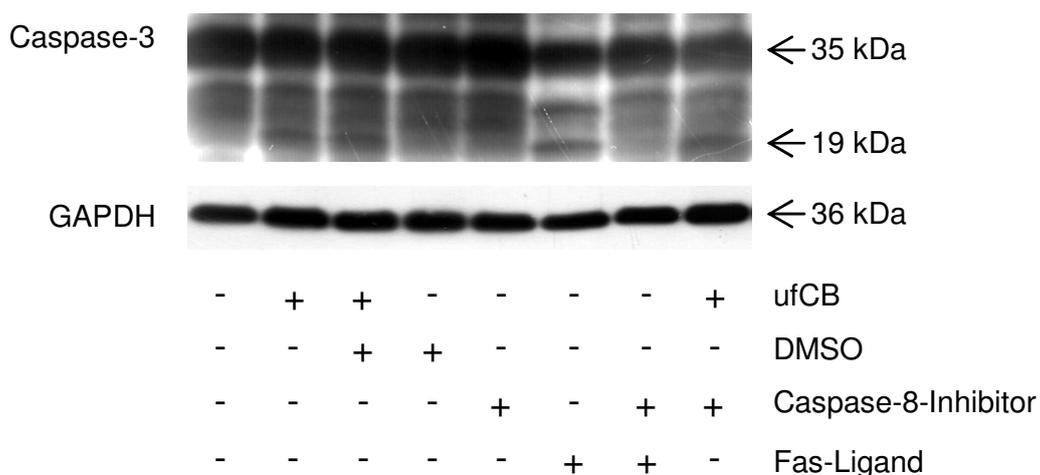


Abbildung 27: Nachweis der Fas-vermittelten Apoptose mittels Western-Blot-Analyse

RLE-Zellen wurden für 8 h mit 10 µg/cm² ufcB belastet. Eine weitere Probe wurde zur Induktion der Apoptose mit 100 ng/ml Fas-Ligand behandelt. Einige Proben wurden zusätzlich für 1 h mit 50 µM Caspase-8-Inhibitor vorbehandelt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

In Abbildung 27 ist eine repräsentative Western-Blot-Analyse von Caspase-3 dargestellt. Die Behandlung mit Fas-Ligand führte zur Aktivierung von Caspase-3 (Spur 6). Eine Präinkubation mit dem Caspase-8-Inhibitor blockierte die Fas-Ligand-induzierte Apoptose vollständig (Spur 7). Die ufCB-induzierte Apoptose wurde durch die Inhibitorbehandlung nicht reduziert (Spur 8).

Das Ergebnis aus Abbildung 27 weist darauf hin, dass die Apoptose in RLE-Zellen über den Todes-Rezeptor Fas unter Beteiligung von Caspase-8 induziert werden kann. Caspase-8 ist aber nicht an der Partikel-induzierten Apoptose beteiligt.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse aus den Abbildungen 24 bis 27 auf eine überwiegend mitochondrial gesteuerte ufCB-induzierte Apoptose hin.

4 DISKUSSION

Ultrafeine Partikel (ufP) sind eine der relevantesten Schadstoffbelastungen in der Außenluft, die sowohl für akute als auch chronische gesundheitliche Wirkungen verantwortlich sind (Peters *et al.*, 1997; Heinrich *et al.*, 2002). Aus epidemiologischen Langzeitstudien ergibt sich ein statistischer Zusammenhang zwischen dauerhafter Partikelbelastung der Außenluft und der Gesamtmortalität, der kardiopulmonalen Mortalität und der Krebsmortalität. Besonders deutlich werden die Effekte bei Menschen mit vorbestehenden Erkrankungen des respiratorischen und kardiovaskulären Systems beobachtet (Dockery *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 1995; Abbey *et al.*, 1999; Pope *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Mortalitätsrate durch eine Zunahme der Feinstaubkonzentration um $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft um bis zu 8% erhöht wird (Samet *et al.*, 2000; Pope *et al.*, 2002). Viele der durchgeführten Studien wurden mit Gemischen aus verschiedenen Partikeltypen durchgeführt. Daher ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen, welche Partikelkomponenten bzw. welche Partikeltypen für die Tumor-induzierenden Eigenschaften verantwortlich sind (Knaapen *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wird von verschiedenen Arbeitsgruppen postuliert, dass nicht der Partikelkern, sondern verschiedene „gebundene“ Substanzen wie Transitionsmetalle oder PAH's für diese Effekte verantwortlich sind (Marano *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Nel *et al.*, 2006). Für eine Risikoabschätzung ist es deshalb umso wichtiger, Studien mit einzelnen Partikeltypen durchzuführen, um Rückschlüsse auf umweltrelevante Partikelgemische machen zu können und Strategien der molekularen Prävention zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kohlenstoffpartikel unterschiedlicher Größe sowie amorphe Silica-Partikel untersucht. Die Kohlenstoffpartikel eignen sich für diese Untersuchungen, da sie repräsentative Umweltpartikel aus Verbrennungsprozessen darstellen, die frei von Transitionsmetallen oder PAH's sind (MacNee & Donaldson, 2003).

4.1 Partikel-induzierte Apoptose und Proliferation

Das in gesundem Gewebe vorhandene Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation ist bei verschiedenen Erkrankungen zu Gunsten eines der beiden Endpunkte verschoben. Partikel-assoziierte Krankheiten wie die chronische obstruktive Erkrankung der Lunge (COPD) oder Asthma gehen mit einer stärkeren Apoptoserate einher (Anderson *et al.*, 1990; MacNee, 2005). Überwiegt jedoch die Proliferation über die Apoptose, kommt es zur Entwicklung von Fibrosen und Neoplasien (Oberdörster, 1997). In diesem Kontext ist aber nicht klar, ob die Proliferation nur eine Kompensation der Apoptose darstellt, oder ob es sich hierbei um zwei voneinander unabhängige Prozesse handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass beide ultrafeinen Partikel, ufCB und amorphes Silica, Dosis-abhängig sowohl die Apoptose (Abb. 6 bis 9) als auch die Proliferation (Abb. 10 bis 12) in kultivierten Lungen-Epithelzellen auslösen. Der Effekt zeigt dabei einen signifikanten Zusammenhang zur Partikelgröße, denn beide Endpunkte werden von den „gröberen“ Partikeln (CB) nicht induziert. Vergleichbare Ergebnisse mit unterschiedlich großen Kohlenstoffpartikeln wurden auch mit primären humanen Bronchial-Epithelzellen erzielt (Tamaoki *et al.*, 2004). Entscheidend ist also nicht die Partikelanzahl oder Masse, sondern die Partikelgröße und die damit verbundene relative Partikeloberfläche. Der Befund deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass sich Partikel-induzierte Effekte besser über die Partikeloberfläche als über die Masse beschreiben lassen (Driscoll, 1996; Oberdörster, 2000; Donaldson *et al.*, 2001a; Oberdörster *et al.*, 2005).

Das Oberflächen-Dosis-Konzept ist wahrscheinlich nur eine erste Annäherung für verschiedene Partikel-induzierte Effekte. Auch die chemische Zusammensetzung der Partikeltypen ist mitentscheidend für das Ausmaß der Reaktion. Es herrscht eine kontroverse Diskussion darüber, ob z.B. bei DEP der Partikelkern oder die auf ihm befindlichen Substanzen wie PAH's und Übergangsmetalle für die Effekte verantwortlich sind. So katalysieren Eisenionen an der Oberfläche von Asbestfasern die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen (Fenton-Reaktion), die sowohl die Apoptose als auch die Proliferation induzieren (Shukla *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 2003b). Auch Extrakte von DEP führten zu einer gesteigerten Apoptoserate in alveolaren Makrophagen und in der humanen Bronchial-Epithelzelllinie BEAS-2B

(Zhao *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu konnten Don Porto Carero und Mitarbeiter (2001) zeigen, dass Russpartikel, nicht aber ihre Extrakte, DNS-Strangbrüche in A549 und THP-1-Zellen (humane myelo-monozytäre Zellen) induzieren. Da die in dieser Studie untersuchten Kohlenstoffpartikel Printex® 90 und Huber 990 frei von Kontaminationen sind, der ultrafeine Partikel aber sowohl Apoptose als auch Proliferation induziert, bestätigen die Ergebnisse die Ansicht, dass der Partikelkern einen wesentlichen Beitrag zur Induktion beider Endpunkte liefert. Außerdem ist der Partikelkern auch in der Lage, ROS zu generieren (Wilson *et al.*, 2002), die zur Induktion beider Endpunkte beitragen (siehe auch 4.5).

Einen weiteren Beleg für die Bedeutung der chemischen Zusammensetzung der Partikel liefert die Tatsache, dass schwerlösliche, ultrafeine Kohlenstoffpartikel einen stärkeren Einfluss auf die Apoptose haben (Abb. 9), während weniger beständige, amorphe Silicapartikel eine höhere Proliferationsrate zur Folge haben (Abb. 12).

In vivo muss man noch bedenken, dass sich ultrafeine Partikel aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit bzw. Oberflächenladung ungleich in der Lunge verteilen bzw. verweilen (Borm *et al.*, 2004). Unlösliche ufP werden nur langsam oder gar nicht aus der Lunge entfernt, weil ihre geringe Größe ein Erkennen durch die Makrophagen erschwert. Eine verminderte Phagozytose erlaubt die längere Interaktion der Partikel mit dem Epithelgewebe. Diese Stimulation kann zur Ausschüttung von Zytokinen führen, die wiederum oxidativen Stress und eine neutrophile Entzündung induzieren (Kim *et al.* 2005).

4.2 Die Partikel-induzierte Proliferation, ein Feedbackmechanismus der Apoptose?

Epithel-Gewebe reagieren auf eine Schädigung des Gewebeverbands häufig mit kompensatorischem Wachstum. Eine solche kompensatorische Proliferation könnte auch nach einer Schädigung durch verschiedene Partikeltypen erfolgen (Fisher & Simnett, 1973; Cagle & Thurlbeck, 1988; Sakamaki *et al.*, 2002). So wird die Induktion der Proliferation in Ratten-Pleura-Mesothel-Zellen nach der Belastung mit Asbest als kompensatorischer Effekt einer vorher verlaufenen Apoptose beschrieben (Goldberg *et al.*, 1997; Buder-Hoffmann *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 2003a). Für ufP ist bisher nicht bekannt, ob die Proliferation eine Kompensation des apoptotischen

Zelltodes ist oder ob es sich dabei um zwei voneinander unabhängig regulierte Prozesse handelt.

Wie gezeigt werden konnte, können ufP sowohl die Apoptose als auch die Proliferation in Rattenlungen-Epithelzellen auslösen (vgl. Abb. 6 bis 12). Dabei besitzt die Partikel-induzierte Apoptose ihr Maximum 8 h nach der Belastung, während eine Zunahme der Proliferation erst nach 24 h zu messen war. Dieser Zeitverlauf unterstützt die von Timblin und Mitarbeitern (2002) postulierte Hypothese, dass die ufP-induzierte Proliferation nur die Kompensation der Apoptose ist. Ihre Aussage basiert auf der Beobachtung, dass eine Belastung mit PM_{2.5} sowohl die Apoptose als auch die Proliferation in einer Maus-Lungen-Epithelzelllinie (C-10 Zellen) induziert. Jedoch konnten sie mit Hilfe eines Ribonuklease-Protection-Assays lediglich zeigen, dass eine Belastung mit ufP Expressionsänderungen von Genen wie *jun*, *fos*, *FAS* und *Caspase-8* verursacht, die mit proliferativen bzw. apoptotischen Signalwegen assoziiert sind. Ihre Hypothese beruht demnach nur auf RNS-Daten und konnte bisher nicht auf Proteinebene bestätigt werden.

Dass es sich bei der ufP-induzierten Proliferation nicht um die Kompensation der Apoptose handelt, lässt sich durch zwei Befunde der vorliegenden Arbeit belegen: Erstens zeigen die Versuche zur Apoptose (Abb. 9) und Proliferation (Abb. 12), dass ultrafeines Carbon Black (ufCB) eine stärkere Apoptose induziert, Silica aber eine stärkere Proliferation. Zweitens blieb die ufCB-induzierte Proliferation in Gegenwart des *Caspase-3*-Inhibitors unverändert.

Für die Induktion der Proliferation ist die Apoptose also nicht erforderlich. Einen zusätzlichen Hinweis liefert der Versuch, in dem Zellen mit dem Apoptose-induzierenden Agens Staurosporin behandelt wurden. Auch unter diesen Bedingungen ist die Proliferationsrate nicht erhöht (Abb. 13). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Proliferation aufgrund der Hemmung von Kinasen durch Staurosporin beeinflusst wird. Jedoch stellt die Spezifität der *Caspase-3*-Inhibition einen ausreichenden Beweis für eine Apoptose-unabhängige ufP-induzierte Proliferation dar.

4.3 Rolle des EGF-Rezeptors und der Integrinrezeptoren bei der ufP-induzierten Apoptose und Proliferation

Die Induktion der Apoptose und das Fortschreiten des Zellzyklus können durch extrazelluläre Reize stimuliert werden. Der EGF-R gehört zu den Rezeptoren, deren Signalwege an der Apoptose beteiligt sind bzw. den Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus vermitteln. Die Bindung eines Liganden führt zur Rezeptordimerisierung und anschließender Phosphorylierung der zytoplasmatischen Rezeptordomänen. Auf diese Weise wird das Signal, nicht aber der Informationsträger selbst, in die Zelle weitergeleitet. Wang und Bonner (2000) konnten zeigen, dass eine frühe EGF-R-Phosphorylierung auch Ligandenunabhängig durch oxidativen Stress vermittelt wird. ROS dringen direkt in die Zelle ein und aktivieren die intrazelluläre Domäne des EGF-R. In diesem Zusammenhang werden Protein-Tyrosinphosphatasen, die mit der Kinase-Domäne des EGF-R assoziiert sind, inhibiert (Bonner, 2002).

Präzipitationsversuche zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus des EGF-R nach Behandlung mit ufCB weisen auf eine zwei-phasige Aktivierung hin (Abb. 14). Dies legt nahe, dass zwei unterschiedliche Stimuli für die Rezeptor-Aktivierung verantwortlich sind. Verschiedene Substanzen, die in der Lage sind, ROS zu generieren, können den EGF-R über den von Wang und Bonner (2000) beschriebenen Mechanismus aktivieren. Bereits 1999 zeigten Zanella und Mitarbeiter, dass auch Asbestfasern die Phosphorylierung des EGF-R mittels ROS induzieren. Es ist daher möglich, dass ufCB-generierte ROS für die frühe Aktivierung des Rezeptors verantwortlich sind.

Der EGF-R kann auch über einen alternativen, autokrinen Weg aktiviert werden. Dong und Wiley (2000) konnten zeigen, dass die humane Epithelzelllinie HB2 nach Belastung mit dem Calmodulin Antagonisten Calmidazol EGF-R-Liganden wie Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin, den Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF) oder TGF- α freisetzt, die zu einer erneuten Aktivierung des Rezeptors führen. Diese Ausschüttung löslicher EGF-R-Liganden ist möglicherweise für die zweite, anhaltende Aktivierung des EGF-R 2 h nach der Belastung mit ufCB verantwortlich (Abb. 14). Versuche mit humanen Bronchial-Epithelzellen, die durch eine Belastung mit $PM_{2.5}$, DEP oder ufCB zur Ausschüttung von Amphiregulin und HB-EGF stimuliert werden, unterstreichen diese Hypothese

(Blanchet *et al.*, 2004; Tamaoki *et al.*, 2004). Beide Studien diskutieren diese Ergebnisse als autokrine Schleife, die eine dauerhafte Aktivierung EGF-R-abhängiger Signalwege vermittelt und durch Partikel-induzierte ROS verursacht wird. Die autokrine Produktion von TGF- α wird auch in Mesotheliomen, Asbest-induzierten Tumoren der Bauchhöhle, beobachtet (Mossman & Grünert, 2002). Außerdem ist die Hochregulation von Amphiregulin bzw. TGF- α und damit die Beteiligung des EGF-R auch als Schlüsselereignis bei der Proliferation von Lungen-Epithelzellen beschrieben (Knaapen *et al.*, 2004).

Eine Aktivierung des EGF-R ist für die Endpunkte Apoptose und Proliferation von entscheidender Bedeutung. Wie die Daten zeigen, ist der EGF-R sowohl an der ufP-induzierten Apoptose als auch der Proliferation beteiligt, denn eine Vorbehandlung der Zellen mit dem EGF-R-spezifischen Inhibitor Tyrphostin AG1478 reduzierte die ufCB-induzierte Apoptose und Proliferation signifikant (Abb. 15). Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstreichen die Bedeutung des EGF-R für die Partikel-induzierten Endpunkte. So konnte eine Beteiligung des Rezeptors sowohl für die Asbest-induzierte Apoptose (Zanella *et al.*, 1999) als auch die Asbest- (Faux *et al.*, 2001) bzw. ufCB-induzierte Proliferation nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls eine Transaktivierung des EGF-R diskutiert, die wiederum nach erneuter Aktivierung der Erk-Kaskade zur Proliferation humaner Lungenzellen führt (Tamaoki *et al.*, 2004).

Neben dem EGF-Rezeptor sind auch Integrine an der Signal-Weiterleitung zur Induktion von Proliferation und Apoptose beteiligt. Integrinrezeptoren stellen das Bindeglied zwischen der EZM und dem Zytoskelett der Zelle dar. Obwohl beide Rezeptorfamilien Signale unanhängig voneinander weiterleiten, führt häufig erst die Wechselwirkung zwischen den Rezeptoren zur Entscheidung, welcher Signalweg aktiviert wird (Eliceiri, 2001).

Die Aktivierung der EGF-R- und der Integrin-Signalkaskade entscheiden über das Schicksal der Zelle. Dabei stellt sich die Frage, welcher Signalweg dominant ist. Wie hier erstmals gezeigt werden konnte, hemmt die Blockade des Integrin-Signalweges durch die Inkubation der Zellen mit den Integrin-spezifischen Inhibitoren RGDS oder anti-CD29 die ufCB-induzierte Proliferation, während die Apoptose-induzierende Signalkaskade unbeeinflusst bleibt (Abb. 16). Dieser Befund deutet auf eine Regulation der Endpunkte Apoptose und Proliferation auf Ebene der Integrine hin. Wird das Signal sowohl vom EGF-R als auch von den Integrinen übertragen, so geht

die belastete Zelle in die S-Phase des Zell-Zyklus über und proliferiert. Bleibt das Integrin-Signal aus, so findet eine EGF-R-abhängige Apoptose statt.

Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsexperimenten und Immunfluoreszenzversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass Integrine und der EGF-R gemeinsam in Clustern vorliegen. In diesen Komplexen können Integrine auch die Aktivierung des EGF-R induzieren (Moro *et al.*, 1998). Außerdem ist diese Integrin-vermittelte Aktivierung des EGF-R häufig notwendig für eine EGF-R-induzierte Proliferation (Eliceiri, 2001; Bill *et al.*, 2004).

Um die Hypothese zu bestätigen, dass das ufCB-induzierte Integrin-Signal entscheidend für die Proliferation ist, muss untersucht werden, ob ufCB auch die Bildung gemeinsamer Integrin-EGF-R-Cluster induziert. In einem weiteren Schritt könnte mittels Inhibitionsstudien mit RGDS und anti-CD29 überprüft werden, ob der EGF-R auch Integrin-unabhängig phosphoryliert wird.

4.4 Partikel-induzierte Signalwege, die Apoptose und Proliferation regulieren

Der EGF-R und die Integrine sind Ausgangspunkt verschiedener intrazellulärer Signalwege, über die sowohl die Apoptose als auch die Proliferation reguliert werden. Die konträre Funktion ein und desselben Rezeptors (EGF-R), dessen Aktivierung zu den beiden unterschiedlichen Endpunkten Apoptose und Proliferation führt, wirft die Frage nach der Regulation dieser Prozesse auf Ebene der Signalwege auf. Die Bedeutung der MAP-Kinasen Jnk1/2 und Erk1/2, die beide durch ufP aktiviert werden (siehe 4.5), ist kontrovers diskutiert. Obwohl der Signalweg über Jnk1/2 von einer Reihe verschiedener Stimuli aktiviert wird, ist seine Rolle in der Apoptose unklar, da die Kinase neutral, pro- oder anti-apoptotisch wirken kann (Davis, 2000). Allerdings führt die Partikel-induzierte Jnk-Aktivierung in den meisten Fällen zur Apoptose (Silbajoris *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wird dem Erk-Signalweg eine proliferative Bedeutung beigemessen (Fang & Richardson, 2005). Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren als experimentelles Werkzeug kann gezeigt werden, dass der Weg über Erk1/2 abhängig von EGF-R und Integrinen spezifisch für die ufCB-induzierte Proliferation ist. Im Gegensatz dazu vermittelt Jnk1/2 EGF-R-abhängig, aber unabhängig von den Integrinen, die Apoptose (Abb. 17 und 18). Die Ergebnisse lassen auf eine Selektivität der MAP-

Kinasen für die Induktion der Endpunkte durch ufCB schließen. Diese Erkenntnis deckt sich mit vorhergehenden Studien an primären humanen Bronchialepithelzellen, in denen die ufCB-induzierte ERK-Aktivierung ebenfalls zur Proliferation führt (Tamaoki *et al.*, 2004). Des Weiteren wird diese Aussage durch die Arbeiten von Li (2002), Zhang (2004) bzw. Kim und Mitarbeitern (2006) zur Partikel-induzierten Apoptose gestützt, die allerdings mit Metall-beladenen Partikeln, DEP oder DEP-Extrakten durchgeführt wurden.

4.5 ROS als initiales Ereignis für Apoptose und Proliferation

Man geht heute davon aus, dass ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien wesentlich zur Entwicklung Partikel-verursachter pulmonaler Erkrankungen beiträgt (Donaldson *et al.*, 2005). UfP sind in der Lage, freie Radikale zu bilden und auf diese Weise oxidativen Stress zu induzieren. Verschiedene Arbeiten favorisieren die Hypothese, dass ROS über reaktive Gruppen auf der Partikeloberfläche, Transitionsmetalle oder die Metabolisierung organischer Verbindungen gebildet werden (Fubini, 1997; Baulig *et al.*, 2003; Knaapen *et al.*, 2004). Die vorliegenden Versuche zeigen jedoch, dass auch ultrafeine Kohlenstoffpartikel, die frei von diesen Substanzen sind, ROS generieren können. Nach der Belastung mit ufCB wurde eine signifikante Abnahme von GSH (Abb. 19), d.h., eine Akkumulation von Glutathiondisulfid detektiert. Dies lässt auf einen indirekten Mechanismus schließen, der auf Erschöpfung der zellulären Glutathion-Vorräte beruht. Durch Hinzufügen des Thiols N-Acetyl-Cystein (NAC), einer Substanz die die zelluläre Glutathionproduktion stimuliert, wurde die Partikel-induzierte ROS-Generation reduziert.

Das chemische Prinzip der ROS-Generation durch reine Kohlenstoffpartikel ist bisher unbekannt, jedoch wird die Vermutung, dass die Größe und damit die reaktive Oberfläche der Partikel dafür verantwortlich sind, durch Experimente mit Partikeln unterschiedlicher Größe gestützt (Zielinski *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2002; Donaldson *et al.*, 2005).

Untersuchungen mit Partikel-belasteten Zellen in der Anwesenheit von Radikalfängern zeigen, dass Partikel, die Transitionsmetalle enthalten oder eine reaktive Oberfläche besitzen, auch in der Lage sind, Apoptose bzw. Proliferation

mittels ROS zu induzieren. Wie in Abbildung 19 gezeigt werden konnte, ist auch ufCB in der Lage, ROS zu generieren. Daher ist es nahe liegend, dass ROS ebenfalls an den ufCB-induzierten Endpunkten beteiligt sind. Einen Beleg für diese Tatsache liefern die Messungen von Apoptose und Proliferation in Anwesenheit von ufCB und NAC (Abb. 20a und 21a).

Oxidativer Stress kann sowohl vom Partikel direkt (primär generierte ROS) als auch von den mit den Partikeln interagierenden Zellen (sekundär generierte ROS) induziert werden (Albrecht *et al.*, 2004; Knaapen *et al.*, 2004). Sekundäre ROS können u.a. in der Atmungskette der Mitochondrien entstehen, indem ufP in die Mitochondrien eindringen und die Funktion der NADPH-Oxidase stören (Li *et al.*, 2003; Oberdörster *et al.*, 2005). Der Umstand, dass der NADPH-Oxidase-Inhibitor DPI die Partikel-induzierte Apoptose bzw. die Proliferation partiell inhibiert (Abb. 20b und 21b), beweist, dass auch mitochondrial-generierte ROS Verursacher der Partikel-induzierten Apoptose bzw. Proliferation sind.

Partikel-generierte ROS aktivieren auch MAP-Kinase-Signalwege (Fubini, 1997; Xiao *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Jnk an der ufCB-induzierten Apoptose und Erk an der Proliferation beteiligt ist (vgl. 4.4). Eine Vorbehandlung mit NAC beweist, dass auch die ufCB-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen ROS-abhängig ist (Abb. 22). Allerdings scheint die frühe JNK-Aktivierung (2 bis 15 min) nicht ROS-abhängig zu sein, da NAC die Phosphorylierung hier nicht reduziert.

Interessanterweise kann oxidativer Stress auch das Öffnen von Kalziumkanälen stimulieren, was einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Folge hat (Ermak & Davies, 2002). Dieser Anstieg kann in alveolaren Makrophagen der Ratte durch ufCB ausgelöst werden (Stone *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2002). Jedoch ist Kalzium auch an der Entstehung von ROS über die NADPH-Oxidase beteiligt (Raddassi *et al.*, 1994). McConkey und Orrenius (1997) konnten zeigen, dass die Apoptose durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels ausgelöst werden kann. Die ufCB-induzierte Apoptose kann ebenfalls durch einen Anstieg der Kalziumkonzentration erreicht werden, denn eine Vorbehandlung mit dem Kalziumkanal-Inhibitor Verapamil reduziert die Apoptoserate signifikant (Abb. 23). Außerdem können entsprechende Signalwege durch Kalzium aktiviert werden, die zu den Endpunkten Apoptose und Proliferation führen. Dabei kann Kalzium den intrinsischen Weg der Apoptose aktivieren (Green & Reed, 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse wird Kalzium eine entscheidende Rolle bei der Induktion von MAP-

Kinase-Signalwegen und den Endpunkten Apoptose und Proliferation zugeschrieben (Adams *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004; Barlow *et al.*, 2005).

4.6 Mechanismus der Partikel-induzierten Apoptose

Der Mechanismus, über den die Partikel-induzierte Apoptose vermittelt ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Verschiedene Arbeitsgruppen postulieren den extrinsischen Weg unter der Beteiligung von Todes-Rezeptoren. Andere Studien zeigen, dass der intrinsische Weg an der Partikel-induzierten Apoptose beteiligt ist (Piguet *et al.*, 1993; Borges *et al.*, 2001; Thibodeau *et al.*, 2004).

UfP sind in der Lage, mit Mitochondrien zu interagieren und so sekundäre ROS zu generieren (Li *et al.*, 2003; Oberdörster *et al.*, 2005). Die Versuche mit DPI (Abb. 20b) zeigen deutlich, dass mitochondrial generierte ROS an der Apoptose beteiligt sind. Eine Wechselwirkung der ufP mit den Mitochondrien könnte zur Freisetzung von Cyt-c führen. Die Untersuchung der Aktivierung spezifischer Caspasen des mitochondrialen und des Liganden-abhängigen Apoptoseweges bestätigen diese Hypothese. Wie hier erstmals gezeigt werden konnte, führt die Belastung der RLE-Zellen mit ufCB zur Freisetzung von Cyt-c und resultiert in der Aktivierung der Caspasen 9 und 3.

Im Gegensatz dazu konnten Timblin und Mitarbeiter (2002) zeigen, dass PM_{2.5} den extrinsischen Weg der Apoptose unter der Beteiligung von Fas aktiviert. Mit Hilfe von Fas-Ligand kann dieser Weg auch in RLE-Zellen angeschaltet werden (Abb. 27), denn Typ-II Zellen des Lungenepithels exprimieren Fas auf ihrer Oberfläche (Matute-Bello *et al.*, 2001). Theoretisch könnte auch eine extrazelluläre ROS-Entstehung durch Wechselwirkung der Partikeloberfläche mit Membrankomponenten zur Aktivierung des Fas-vermittelten Apoptoseweges führen. Da eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Caspase-8-Inhibitor Z-IETD-FMK zwar die Fas-Ligand-induzierte, nicht aber die Partikel-induzierte Caspase-3-Spaltung verhindert (Abb. 27), lässt dies den Schluss zu, dass die ufCB-induzierte Apoptose jedoch ausschließlich über den intrinsischen Weg abläuft.

4.7 Die Einordnung dieser Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ufP aufgrund ihrer Größe in der Lage sind, sowohl die Apoptose als auch die Proliferation zu induzieren. Bislang wurde aus der Literatur nicht klar, dass ufP beide Endpunkte unabhängig voneinander auslösen.

Die Befunde anderer Arbeitsgruppen zur Phosphorylierung des EGF-R und zur Aktivierung verschiedener MAP-Kinase-Signalwege durch ufP konnten den beiden Endpunkten, Apoptose und Proliferation, eindeutig zugewiesen werden. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass Integrine an der Vermittlung ufP-induzierter Effekte beteiligt sind. Der Zusammenhang zwischen der ufP-abhängigen ROS-Freisetzung und den Endpunkten Apoptose und Proliferation, sowie den spezifischen Signalwegen, wurde aufgeklärt.

Die vorliegende Arbeit liefert somit einen Beitrag zum Verständnis der Wechselwirkungen von ufP mit exponierten Zellen. UfP werden nicht nur in der Lunge deponiert, sondern können auch in andere Körperkompartimente vordringen (Oberdörster *et al.*, 2005). Es besteht nun die Möglichkeit, die Abläufe der ufP-induzierten Apoptose und Proliferation auch in anderen Zellen zu untersuchen und somit die Rolle der ufP an der Induktion verschiedener Erkrankungen zu erforschen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Feinstaub stellt eine der relevantesten Schadstoffbelastungen in der Außenluft dar, die sowohl für akute wie auch chronische Erkrankungen verantwortlich ist. Aufgrund dieser Problematik gibt es seit dem 1. Januar 2005 Richtlinien der europäischen Union, nach denen Grenzwerte eingehalten werden müssen. Aufgrund ihrer geringen Größe und den damit verbundenen Oberflächeneigenschaften wird den ultrafeinen Partikeln (ufP) hohe Bedeutung beigemessen.

Zellen reagieren auf extrazelluläre Stimuli mit der Aktivierung von Signalkaskaden, die Einfluss auf Apoptose und Proliferation nehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus der ufP-induzierten Endpunkte Apoptose und Proliferation in der Rattenlungen-Epithelzelllinie RLE-6TN charakterisiert. Beide Endpunkte Apoptose und Proliferation werden durch ufP verschiedener chemischer Zusammensetzung induziert. Im Gegensatz zu ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (14 nm) induzieren feine Partikel (260 nm) desselben Materials diese Endpunkte nicht. Die Induktion beider Endpunkte ist demzufolge von der Größe, der chemischen Zusammensetzung und der Dosis abhängig. Die Signalwege, die von den Rezeptoren ausgehend zur Ausprägung von Apoptose oder Proliferation führen, wurden eindeutig identifiziert und dem jeweiligen Endpunkt zugeordnet. Durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren wurde die Regulation der ufP-induzierten Endpunkte auf Ebene des EGF-R und der Integrine festgestellt. Der EGF-R reguliert sowohl die Apoptose als auch die Proliferation. Im Gegensatz dazu ist das Integrin-Signal spezifisch für die Proliferation. Auch die von den Rezeptoren aktivierten MAP-Kinasen Jnk1/2 und Erk1/2 sind an der Regulation von Apoptose und Proliferation beteiligt. Dabei zeigte sich, dass die ufP-induzierte Apoptose Jnk-abhängig ist, die Proliferation hingegen über Erk reguliert wird. Beide ufP-induzierten Endpunkte sowie die spezifischen MAP-Kinase-Signalwege konnten mit Hilfe des Radikalfängers N-Acetyl-Cystein und dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Diphenyleneiodonium inhibiert werden. Auch die beiden Endpunkte Apoptose und Proliferation werden mit Hilfe dieser Substanzen inhibiert, so dass man ROS als Auslöser der initialen Ereignisse betrachten kann. Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in Lungen-Epithelzellen sowohl Apoptose als auch Proliferation unabhängig voneinander über spezifische Signalwege durch ultrafeine Partikel ausgelöst werden.

6 LITERATUR

Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence BW, Yang JX (1999) Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 373-382

Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM (2001) Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276: 20316-20322

Albrecht C, Borm PJ, Unfried K (2004) Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutat Res* 553: 23-35

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270: 27489-27494

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113: 548-555

Anderson PJ, Wilson JD, Hiller FC (1990) Respiratory tract deposition of ultrafine particles in subjects with obstructive or restrictive lung disease. *Chest* 97: 1115-1120

Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072: 129-157

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50: 197-263

Attwell S, Roskelley C, Dedhar S (2000) The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 19: 3811-3815

Bair WJ, Bailey MR, Cross FT, Cuddihy RG, Gehr P, James AC, Johnson JR, Masse R, Roy M, Stahlhofen W (1994) Human respiratory tract model for radiological protection. ICRP Publication 66. *Ann. ICRP* 24

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

Bartek J, Bartkova J, Lukas J (1997) The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res* 237: 1-6

Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A (2003) Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L671-L679

Ben Ze'ev A (1997) Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 9: 99-108

- Berken A, Abel J, Unfried K (2003) beta1-integrin mediates asbestos-induced phosphorylation of AKT and ERK1/2 in a rat pleural mesothelial cell line. *Oncogene* 22: 8524-8528
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 77: 347-357
- Berry JP, Arnoux B, Stanislas G, Galle P, Chretien J (1977) A microanalytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine* 27: 354-357
- BeruBe KA, Quinlan TR, Fung H, Magae J, Vacek P, Taatjes DJ, Mossman BT (1996) Apoptosis is observed in mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 141-147
- Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS, Miranti CK (2004) Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 24: 8586-8599
- Blanchet S, Ramgolam K, Baulig A, Marano F, Baeza-Squiban A (2004) Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 421-427
- Bonner JC (2002) The epidermal growth factor receptor at the crossroads of airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L528-L530
- Booth BW, Adler KB, Bonner JC, Tournier F, Martin LD (2001) Interleukin-13 induces proliferation of human airway epithelial cells in vitro via a mechanism mediated by transforming growth factor-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 739-743
- Borges VM, Falcao H, Leite-Junior JH, Alvim L, Teixeira GP, Russo M, Nobrega AF, Lopes MF, Rocco PM, Davidson WF, Linden R, Yagita H, Zin WA, DosReis GA (2001) Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med* 194: 155-164
- Borm PJ, Schins RP, Albrecht C (2004) Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *Int J Cancer* 110: 3-14
- Broadus VC, Yang L, Scavo LM, Ernst JD, Boylan AM (1996) Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species. *J Clin Invest* 98: 2050-2059
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2001) Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 175: 191-199
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V (2004) Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L344-L353
- Buder-Hoffmann S, Palmer C, Vacek P, Taatjes D, Mossman B (2001) Different accumulation of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) and role in

cell-cycle alterations by epidermal growth factor, hydrogen peroxide, or asbestos in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 405-413

Cabodi S, Moro L, Bergatto E, Boeri EE, Di Stefano P, Turco E, Tarone G, Defilippi P (2004) Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem Soc Trans* 32: 438-442

Cagle PT, Thurlbeck WM (1988) Postpneumonectomy compensatory lung growth. *Am Rev Respir Dis* 138: 1314-1326

Campbell S, Otis M, Cote M, Gallo-Payet N, Payet MD (2003) Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology* 144: 1486-1495

Carvalho H, Evelson P, Sigaud S, Gonzalez-Flecha B (2004) Mitogen-activated protein kinases modulate H₂O₂-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells. *J Cell Biochem* 92: 502-513

Castranova V, Vallyathan V (2000) Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4: 675-684

Castranova V (2004) Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 37: 916-925

Chen F, Demers LM, Shi X (2002) Upstream signal transduction of NF-kappaB activation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 137-149

Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burrige K, Juliano RL (1994) Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 269: 26602-26605

Chess PR, O'Reilly MA, Sachs F, Finkelstein JN (2005) Reactive oxidant and p42/44 MAP kinase signaling is necessary for mechanical strain-induced proliferation in pulmonary epithelial cells. *J Appl Physiol* 99: 1226-1232

Clark EA, Brugge JS (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268: 233-239

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16

Cory S, Huang DC, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607

Costa DL, Dreher KL (1997) Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5: 1053-1060

Craighead JE, Mossman BT (1982) The pathogenesis of asbestos-associated diseases. *N Engl J Med* 306: 1446-1455

- Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252
- Dedhar S, Hannigan GE (1996) Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* 8: 657-669
- Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M (2003) An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 1-8
- Derradji H, Baatout S (2003) Apoptosis: a mechanism of cell suicide. *In Vivo* 17: 185-192
- Dockery DW, Pope CA, III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Jr., Speizer FE (1993) An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329: 1753-1759
- Dockery DW, Pope CA, III (1994) Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 15: 107-132
- Don Porto CA, Hoet PH, Verschaeve L, Schoeters G, Nemery B (2001) Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* 37: 155-163
- Donaldson K, MacNee W (2001a) Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *Int J Hyg Environ Health* 203: 411-415
- Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W (2001b) Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4: 523-527
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W (2001) Ultrafine particles. *Occup Environ Med* 58: 211-6, 199
- Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V (2002) The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 15: 213-220
- Donaldson K, Stone V (2003) Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* 39: 405-410
- Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W (2003) Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med* 34: 1369-1382
- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V (2005) Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 2: 10
- Donaldson K (2006) The biological effects of coarse and fine particulate matter. *Occup. Environ. Med* 60: 313-314

- Dong J, Wiley HS (2000) Trafficking and proteolytic release of epidermal growth factor receptor ligands are modulated by their membrane-anchoring domains. *J Biol Chem* 275: 557-564
- Driscoll KE, Carter JM, Iype PT, Kumari HL, Crosby LL, Aardema MJ, Isfort RJ, Cody D, Chestnut MH, Burns JL, . (1995) Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31: 516-527
- Driscoll KE (1996) Effects of fibres on cell proliferation, cell activation and gene expression. *IARC Sci Publ* 73-96
- Eliceiri BP (2001) Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res* 89: 1104-1110
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77
- Ermak G, Davies KJ (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 38: 713-721
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348
- Fadeel B, Orrenius S (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258: 479-517
- Fang JY, Richardson BC (2005) The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6: 322-327
- Faux SP, Houghton CE, Hubbard A, Patrick G (2000) Increased expression of epidermal growth factor receptor in rat pleural mesothelial cells correlates with carcinogenicity of mineral fibres. *Carcinogenesis* 21: 2275-2280
- Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992) Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 535-542
- Finlayson-Pitts BJ, Pitts JN, Jr. (1997) Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276: 1045-1052
- Fisher JM, Simnett JD (1973) Morphogenetic and proliferative changes in the regenerating lung of the rat. *Anat Rec* 176: 389-395
- Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C (2002) Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 116-119
- Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G, Ciardiello F (1998) Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* 4: 241-249

- Friemann J, Albrecht C, Breuer P, Grover R, Weishaupt C (1999) Time-course analysis of type II cell hyperplasia and alveolar bronchiolization in rats treated with different particulates. *Inhal Toxicol* 11: 837-854
- Frisch SM, Ruoslahti E (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9: 701-706
- Fubini B (1997) Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5: 1013-1020
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501
- Giancotti FG, Mainiero F (1994) Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1198: 47-64
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032
- Goldberg JL, Zanella CL, Janssen YM, Timblin CR, Jimenez LA, Vacek P, Taatjes DJ, Mossman BT (1997) Novel cell imaging techniques show induction of apoptosis and proliferation in mesothelial cells by asbestos. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 265-271
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312
- Greim H, Borm P, Schins R, Donaldson K, Driscoll K, Hartwig A, Kuempel E, Oberdörster G, Speit G (2001) Toxicity of fibers and particles. Report of the workshop held in Munich, Germany, 26-27 October 2000. *Inhal Toxicol* 13: 737-754
- Griffey SM, Kraegel SA, Madewell BR (1999) Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and mitotic counts. *J Comp Pathol* 120: 321-332
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274: 1156-1163
- Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 184-189
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- Hapke S, Kessler H, Lubert B, Bengel A, Hutzler P, Hofler H, Schmitt M, Reuning U (2003) Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem* 384: 1073-1083
- Heinrich J, Grote V, Peters A, Wichmann HE (2002) Gesundheitliche Wirkungen von Feinstaub: Epidemiologie der Langzeiteffekte. *Umweltmed Forsch Prax* 7: 91-99

- Heyder J, Gebhart J, Rudolf G, Schiller CF, Stahlhofen W (1986) Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005-15 μm . *J Aerosol Sci* 17: 811-825
- Hinds PW, Mitnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70: 993-1006
- Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV (2004) Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2: 12
- Howe AK, Juliano RL (1998) Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 273: 27268-27274
- Humphries MJ, Travis MA, Clark K, Mould AP (2004) Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem Soc Trans* 32: 822-825
- Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25
- James AC, Stahlhofen W, Rudolf G, Köbrich R, Briant JK, Egan MJ, Nixon W, Birchall A (1994) Annexe D - deposition of inhaled particles. *Annals of the ICRP* 24(1-3): 231-299
- Kaminska B (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 1754: 253-262
- Kamp DW, Panduri V, Weitzman SA, Chandel N (2002) Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis: role of mitochondrial dysfunction caused by iron-derived free radicals. *Mol Cell Biochem* 234-235: 153-160
- Karin M, Shaulian E (2001) AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life* 52: 17-24
- Kato J, Matsushima H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ (1993) Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7: 331-342
- Khokhlatchev A, Xu S, English J, Wu P, Schaefer E, Cobb MH (1997) Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases. *J Biol Chem* 272: 11057-11062
- Kim YM, Reed W, Lenz AG, Jaspers I, Silbajoris R, Nick HS, Samet JM (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: L432-L441

- Kim YM, Reed W, Wu W, Bromberg PA, Graves LM, Samet JM (2006) Zn²⁺-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L1028-L1035
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588
- Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP (2004) Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer* 109: 799-809
- Kreuter J (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47: 65-81
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Moller W (2006) Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J Aerosol Med* 19: 74-83
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60: 619-642
- Kunduzova OR, Bianchi P, Pizzinat N, Escourrou G, Seguelas MH, Parini A, Cambon C (2002) Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue regeneration by monoamine oxidases after renal ischemia-reperfusion. *FASEB J* 16: 1129-1131
- Landrigan PJ (1987) Silicosis. *Occup Med* 2: 319-326
- Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM (2005) Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* 205: 147-157
- Lapp NL, Castranova V (1993) How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop--a cellular assessment. *Occup Med* 8: 35-56
- Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G, Pouyssegur J (1996) A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res* 2: 49-58
- Lee KP, Kelly DP, Schneider PW, Trochimowicz HJ (1986) Inhalation toxicity study on rats exposed to titanium tetrachloride atmospheric hydrolysis products for two years. *Toxicol Appl Pharmacol* 83: 30-45
- Lee MR, Dominguez C (2005) MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. *Curr Med Chem* 12: 2979-2994
- Lee VY, Schroedl C, Brunelle JK, Buccellato LJ, Akinci OI, Kaneto H, Snyder C, Eisenbart J, Budinger GR, Chandel NS (2005) Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L521-L528
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111: 455-460

- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489
- Loft S, Poulsen HE, Vistisen K, Knudsen LE (1999) Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage, in urban bus drivers. *Mutat Res* 441: 11-19
- Lowe SW, Cepero E, Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432: 307-315
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- MacNee W, Li XY, Gilmour PS, Donaldson K (1997) Proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Ann Occup Hyg* 41 (Suppl I): 7-13
- MacNee W, Donaldson K (2003) Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl* 40: 47s-51s
- MacNee W (2005) Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2: 258-266
- Manning CB, Cummins AB, Jung MW, Berlinger I, Timblin CR, Palmer C, Taatjes DJ, Hemenway D, Vacek P, Mossman BT (2002) A mutant epidermal growth factor receptor targeted to lung epithelium inhibits asbestos-induced proliferation and proto-oncogene expression. *Cancer Res* 62: 4169-4175
- Manning FC, Patierno SR (1996) Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer Invest* 14: 455-465
- Marano F, Boland S, Bonvallet V, Baulig A, Baeza-Squiban A (2002) Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biol Toxicol* 18: 315-320
- Martindale JL, Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192: 1-15
- Massague J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432: 298-306
- Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46: 6387-6392
- Matsuo M, Shimada T, Uenishi R, Sasaki N, Sagai M (2003) Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells. *Biol Pharm Bull* 26: 438-447
- Mattila E, Pellinen T, Nevo J, Vuoriluoto K, Arjonen A, Ivaska J (2005) Negative regulation of EGFR signalling through integrin- α 1 β 1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol* 7: 78-85

Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, Nakamura M, Ballman K, Vathanaprida C, Kiener PA, Martin TR (2001) Recombinant human fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L328-L335

McConkey DJ, Orrenius S (1997) The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 357-366

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16: 2794-2804

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

Mendelsohn J (2001) The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8: 3-9

Mizejewski GJ (1999) Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 124-138

Moghimi SM, Hunter AC (2001) Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 18: 527-550

Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291

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

Mossman BT, Churg A (1998) Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1666-1680

Mossman BT, Gruenert DC (2002) SV40, growth factors, and mesothelioma: another piece of the puzzle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 167-170

Möller W, Brown DM, Kreyling WG, Stone V (2005) Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. *Part Fibre Toxicol* 2: 7

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

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

Nikula KJ (2000) Rat lung tumors induced by exposure to selected poorly soluble nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* 12: 97-119

Obaya AJ, Sedivy JM (2002) Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 59: 126-142

- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994) Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5: 173-179
- Oberdörster G (1997) Pulmonary carcinogenicity of inhaled particles and the maximum tolerated dose. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5: 1347-1355
- Oberdörster G (2000) Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philos Trans R Soc Lond A* 358: 2719-2740
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* 65: 1531-1543
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113: 823-839
- Oberdörster G (2001) Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 74: 1-8
- Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE (1998) ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18: 5042-5051
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619
- Orrenius S (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 149: 19-23
- Panduri V, Weitzman SA, Chandel N, Kamp DW (2003) The mitochondria-regulated death pathway mediates asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 241-248
- Panduri V, Weitzman SA, Chandel NS, Kamp DW (2004) Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1220-L1227
- Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA, Kinnally KW (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155: 725-731
- Penttinen P, Timonen KL, Tiittanen P, Mirme A, Ruuskanen J, Pekkanen J (2001) Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *Eur Respir J* 17: 428-435
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997) Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1376-1383
- Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA (2001) Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103: 2810-2815

Piguet PF, Rosen H, Vesin C, Grau GE (1993) Effective treatment of the pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica with anti-CD-11 antibodies. *Am Rev Respir Dis* 147: 435-441

Pope CA, III (1989) Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley. *Am J Public Health* 79: 623-628

Pope CA, III, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW, Jr. (1995) Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 669-674

Pope CA, III (2000) Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4: 713-723

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

Pope CA, III, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ (2004) Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109: 71-77

Pope CA, III, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ (2004) Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109: 71-77

Raddassi K, Berthon B, Petit JF, Lemaire G (1994) Role of calcium in the activation of mouse peritoneal macrophages: induction of NO synthase by calcium ionophores and thapsigargin. *Cell Immunol* 153: 443-455

Rae T (1977) Tolerance of mouse macrophages in vitro to barium sulfate used in orthopedic bone cement. *J Biomed Mater Res* 11: 839-846

Ramos-Nino ME, Haegens A, Shukla A, Mossman BT (2002) Role of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in cell injury and proliferation by environmental particulates. *Mol Cell Biochem* 234-235: 111-118

Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2003) Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5: 733-740

Robledo RF, Buder-Hoffmann SA, Cummins AB, Walsh ES, Taatjes DJ, Mossman BT (2000) Increased phosphorylated extracellular signal-regulated kinase immunoreactivity associated with proliferative and morphologic lung alterations after chrysotile asbestos inhalation in mice. *Am J Pathol* 156: 1307-1316

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

- Ruoslahti E (1999) Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res* 76: 1-20
- Sadowska AM, Manuel YK, De Backer WA (2006) Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effects: A review. *Pulm Pharmacol Ther*
- Sakamaki Y, Matsumoto K, Mizuno S, Miyoshi S, Matsuda H, Nakamura T (2002) Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 525-533
- Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL (2000) Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med* 343: 1742-1749
- Sandhu H, Dehnen W, Roller M, Abel J, Unfried K (2000) mRNA expression patterns in different stages of asbestos-induced carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 21: 1023-1029
- Sarih M, Souvannavong V, Brown SC, Adam A (1993) Silica induces apoptosis in macrophages and the release of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. *J Leukoc Biol* 54: 407-413
- Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR (2004) The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 10: 4227s-4232s
- Scapoli L, Ramos-Nino ME, Martinelli M, Mossman BT (2004) Src-dependent ERK5 and Src/EGFR-dependent ERK1/2 activation is required for cell proliferation by asbestos. *Oncogene* 23: 805-813
- Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19: 2435-2444
- Schoenwaelder SM, Burrige K (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11: 274-286
- Schwartz MA, Assoian RK (2001) Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114: 2553-2560
- Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, Chilvers ER, Dransfield I, Donnelly SC, Strieter R, Haslett C (1999) Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 5: 662-668
- Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677
- Shukla A, Timblin C, BeruBe K, Gordon T, McKinney W, Driscoll K, Vacek P, Mossman BT (2000) Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 182-187
- Shukla A, Timblin CR, Hubbard AK, Bravman J, Mossman BT (2001) Silica-induced activation of c-Jun-NH2-terminal amino kinases, protracted expression of the

activator protein-1 proto-oncogene, fra-1, and S-phase alterations are mediated via oxidative stress. *Cancer Res* 61: 1791-1795

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

Shukla A, Jung M, Stern M, Fukagawa NK, Taatjes DJ, Sawyer D, Van Houten B, Mossman BT (2003b) Asbestos induces mitochondrial DNA damage and dysfunction linked to the development of apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1018-L1025

Silbajoris R, Ghio AJ, Samet JM, Jaskot R, Dreher KL, Brighton LE (2000) In vivo and in vitro correlation of pulmonary MAP kinase activation following metallic exposure. *Inhal Toxicol* 12: 453-468

Spurny KR (1998) On the physics, chemistry and toxicology of ultrafine anthropogenic, atmospheric aerosols (UAAA): new advances. *Toxicol Lett* 96-97: 253-261

Stone V, Shaw J, Brown DM, MacNee W, Faux SP, Donaldson K (1998) The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of Ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicology in Vitro* 12: 649-659

Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Petterson S, Faux SP, Borm P, MacNee W, Michaelangeli F, Donaldson K (2000) Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J* 15: 297-303

Tamaoki J, Isono K, Takeyama K, Tagaya E, Nakata J, Nagai A (2004) Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1127-L1133

Thibodeau MS, Giardina C, Knecht DA, Helble J, Hubbard AK (2004) Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol Sci* 80: 34-48

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316

Timblin C, BeruBe K, Churg A, Driscoll K, Gordon T, Hemenway D, Walsh E, Cummins AB, Vacek P, Mossman B (1998) Ambient particulate matter causes activation of the c-jun kinase/stress-activated protein kinase cascade and DNA synthesis in lung epithelial cells. *Cancer Res* 58: 4543-4547

Timblin CR, Shukla A, Berlanger I, BeruBe KA, Churg A, Mossman BT (2002) Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 179: 98-104

Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ (2003) Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* 111: 1202-1208

- Tsuji T (2004) Physiological and pathological roles of alpha3beta1 integrin. *J Membr Biol* 200: 115-132
- Van Oss CJ, Giese RF, Docoslis A (2001) Water, treated as the continuous liquid in and around cells. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 47: 721-733
- Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 489-501
- Walczak H, Krammer PH (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256: 58-66
- Wang YZ, Bonner JC (2000) Mechanism of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 590-596
- Warheit DB, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr S, Hartsky MA (1996) Subchronic inhalation of high concentrations of low toxicity, low solubility particulates produces sustained pulmonary inflammation and cellular proliferation. *Toxicol Lett* 88: 249-253
- Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI, Hartsky MA (1997) Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 145: 10-22
- Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG (1996) The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87: 733-743
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330
- Wichmann HE, Heinrich J (1995) Health effects of high level exposure to traditional pollutants in East Germany--review and ongoing research. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 2: 29-35
- Wilkinson MG, Millar JB (2000) Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 14: 2147-2157
- Williams MJ, Hughes PE, O'Toole TE, Ginsberg MH (1994) The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol* 4: 109-112
- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002) Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 184: 172-179
- Wolf BB, Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274: 20049-20052
- Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE (2003) Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem* 278: 50781-50790

- Yuan Z, Taatjes DJ, Mossman BT, Heintz NH (2004) The duration of nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 signaling during cell cycle reentry distinguishes proliferation from apoptosis in response to asbestos. *Cancer Res* 64: 6530-6536
- Zanella CL, Posada J, Tritton TR, Mossman BT (1996) Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 56: 5334-5338
- Zanella CL, Timblin CR, Cummins A, Jung M, Goldberg J, Raabe R, Tritton TR, Mossman BT (1999) Asbestos-induced phosphorylation of epidermal growth factor receptor is linked to c-fos and apoptosis. *Am J Physiol* 277: L684-L693
- Zhang Q, Kleeberger SR, Reddy SP (2004) DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L427-L436
- Zhao XH, Wang XL, Li XY (2001) Automobile exhaust particle-induced apoptosis and necrosis in MRC-5 cells. *Toxicol Lett* 122: 103-110
- Zhou Y, Wang Q, Evers BM, Chung DH (2005) Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res* 58: 1192-1197
- Zielinski H, Mudway IS, BeruBe KA, Murphy S, Richards R, Kelly FJ (1999) Modeling the interactions of particulates with epithelial lining fluid antioxidants. *Am J Physiol* 277: L719-L726
- Zöfel P (1992) Statistik in der Praxis – 3. überarbeitete Auflage, G. Fischer Verlag, Jena

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampère
ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethyl-benz-thiazolin]-6-sulfonat
APAF-1	Apoptose-Protease-Aktivierungs-Faktor-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CB	feines Carbon Black
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
DTNB	2,2'-dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced-Chemo-Lumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FADD	„fas associated death domain“
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	fötales Kälberserum
<i>g</i>	Gravitation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase
GRB2	Growthfactor Receptor-Bound Protein 2
GRed	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde

HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Peroxidase
IAP	„inhibitor-of-apoptosis protein“
IFN- γ	Interferon- γ
ILK	Integrin-gebundene-Kinase
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LDH	Laktat-Dehydrogenase
μ	mikro
m	milli
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
min	Minute
n	nano
NAC	N-Acetyl-Cystein
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaF	Natriumfluorid
NF κ B	nuklearer Transkriptionsfaktor Kappa B
NP	Nanopartikel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH's	Polyaromatische Hydrocarbone
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PCNA	„proliferating cell nuclear antigene“
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PM	Particulate Matter
POD	Peroxidase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PKB	Protein-Kinase B
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RLE	Ratten-Lungen-Epithel

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smac/DIABLO	„second mitochondria derived activator of caspase / direct IAP-binding protein with low pI”
SOS	„son of sevenless”
S-Phase	Synthese-Phase
SSA	Sulfosalicylsäure
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TdT	terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformierender-Wachstums-Faktor- β
TNB	Thionitrobenzoat-Anion
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	transferase-mediated dUTP nick end labeling
ufCB	ultrafeines Carbon Black
ufP	ultrafeine Partikel
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VP	Vinylpyridin
w/v	Gewicht/Volumen

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Josef Abel für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die umfassende Betreuung und Unterstützung.

Herrn Prof. Frank Wunderlich danke ich dafür, dass er als Koreferent zur Verfügung steht und die Fakultätsübergreifende Betreuung ermöglicht.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Unfried für seine jederzeit gewährte Unterstützung, die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten und für viele wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen.

Ich möchte ebenfalls den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Toxikologie für die gute Zusammenarbeit und die vielen Hilfestellungen in fachlichen und anderen Fragen danken. Ragnhild Wirth und Winfried Brock danke ich für ihre technische Unterstützung. Darüber hinaus gilt mein Dank besonders meinen Laborkollegen Thomas Haarmann-Stemmann und Thorsten Bernshausen für die schöne Zeit bei den Toxikologie-Kursen („nothing´s impossible“).

Allen Mitarbeitern des Instituts für umweltmedizinische Forschung danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, besonders Dr. Peter Schröder und Susanne Wild für die umfangreiche Einweisung in die Glutathion-Messung.

Bei meinen Freunden Andre, Basti, Gereon, Jörg und Ralf möchte ich mich bedanken, weil sie mich immer wieder aufgemuntert haben und stets mit Rat, Tat und einem Bier zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und meiner „Schwieger-Familie“, die immer an mich geglaubt und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Meiner Frau Carolin danke ich von ganzem Herzen für ihre Geduld, Liebe und moralische Unterstützung und dafür, dass sie immer für mich da ist.

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.

(Ulrich Sydlik)

Düsseldorf, den 19. Mai 2006