

**Mechanismen und Konsequenzen der Partikelaufnahme  
in alveolaren Makrophagen.  
*Rolle des Aktinzytoskeletts und des Fcγ-Rezeptors-II***

**Inaugural-Dissertation**

zur

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

vorgelegt von

**Petra Haberzettl**

aus Krefeld

**November/2006**

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

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

Referent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Koreferent: Prof. Dr. P. Borm

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2006

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

Düsseldorf, den 23.11.2006

Petra Haberzettl

Meinem Ehemann.

Life does not put things in front of you that you are unable to handle.

(unknown)



---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Inhalierbare Partikel und ihre Bedeutung in der Pathogenese</b>	
<b>von Lungenerkrankungen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Partikelinduzierte pulmonale Gesundheitsrisiken .....	1
1.1.2 Quarzstäube und Silikose .....	3
1.1.3 Mechanismen der partikelinduzierten Entzündungsreaktion .....	5
1.1.4 Die Partikelgröße, ein entscheidender Faktor .....	9
1.1.5 Partikel der Studie .....	10
<b>1.2 Abwehrmechanismen in der Lunge</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Makrophagen des Respirationstrakt .....	11
1.2.2 Alveolare Makrophagen .....	12
<b>1.3 Mechanismen der Partikelaufnahme</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Grundlegende zelluläre Mechanismen der Stoffaufnahme .....	14
1.3.2 Die Phagozytose .....	15
1.3.3 Molekulare Mechanismen der Phagozytose .....	16
1.3.3.1 Die FcR medierte Phagozytose .....	19
1.3.3.2 Die CR (Komplementrezeptor) medierte Phagozytose .....	25
1.3.3.3 Andere an der Phagozytose beteiligte Integrine .....	27
1.3.3.4 Die Mannoserezeptor medierte Phagozytose .....	27
1.3.3.5 Die Scavenger-Rezeptor vermittelte Phagozytose .....	29
1.3.3.6 Pro- und anti-inflammatorische Antwort auf die Phagozytose .....	31
<b>1.4 Zielsetzung</b> .....	<b>32</b>
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>35</b>
2.1.1 Zelllinien und Tiere .....	35
2.1.2 Partikel .....	35
2.1.3 Chemikalienliste .....	35
2.1.4 Geräte .....	38
2.1.5 Verwendete Software .....	39
2.1.6 Verbrauchsmaterialien .....	39
2.1.7 Lösungen .....	40

## 2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden .....	41
2.2.1.1 Kultivierung der NR8383 Makrophagen und der A549 Epithelzellen .....	41
2.2.1.2 Isolierung primäre Zellen .....	41
2.2.1.3 Aussaat der NR8383- und A549-Zellen sowie primärer AM und IM .....	43
2.2.1.4 Partikelauflbereitung, Partikelbelastung und Inhibition der Zellen .....	44
2.2.2 Bestimmung der Partikelzelltoxizität .....	47
2.2.2.1 MTT-Assay .....	47
2.2.2.2 MTS-Assay .....	49
2.2.2.3 Trypanblaufärbung .....	50
2.2.2.4 LDH-Assay .....	51
2.2.2.5 Statistische Analyse .....	52
2.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Partikelaufnahme .....	53
2.2.3.1 Messtechnik .....	53
2.2.3.2 Praktische Durchführung .....	55
2.2.3.3 Datenanalyse .....	55
2.2.4 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden .....	58
2.2.4.1 Zellyse .....	58
2.2.4.2 Proteinbestimmung mit Bicinchonnischer-Säure .....	59
2.2.4.3 Pulldown-Assay (Affinitätspräzipitation der aktivierten GTPasen Rac1, Cdc42 und Rho) .....	59
2.2.4.4 SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) .....	60
2.2.4.5 Western Blot .....	61
2.2.4.5 Aufarbeitung und Detektion der Western Blots .....	61
2.2.4.6 Auswertung und statistische Analyse der Western Blots .....	63
2.2.5 Mikroskopische und immunohistomische Methoden .....	64
2.2.5.1 Zytopinpräparation .....	64
2.2.5.2 May-Giemsa-Grünwald-Färbung .....	64
2.2.5.3 Immunohistochemie .....	65
2.2.5.4 Zeitaugelöste Mikroskopie .....	66
2.2.5.5 SWNT Brightfield- und NIR-Mikroskopie .....	67
2.2.6 Messung der ROS Generierung .....	68
2.2.6.1 Messung der extrazellulären ROS-Bildung durch ESR-Spektroskopie .....	68
2.2.6.1.1 Messtechnik .....	68
2.2.6.1.2 Praktische Durchführung .....	70
2.2.6.2 Durchflusszytometrische Messung der intrazellulären ROS Generierung ..	71
2.2.6.2.1 Messtechnik .....	71

2.2.6. 2.2 <i>Praktische Durchführung</i> .....	72
2.2.6. 2.3 <i>Datenanalyse</i> .....	72
2.2.6.3 Messung der ROS Generierung durch den Lucigenin-Assay .....	74
2.2.6.3.1 <i>Messtechnik</i> .....	74
2.2.6.3.2 <i>Praktische Durchführung</i> .....	75
2.2.6.3.3 <i>Datenanalyse</i> .....	75
2.2.7 TNF- $\alpha$ -ELISA .....	76
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>77</b>
<b>3.1 Etablierung von Methoden zur Bestimmung der Zelltoxizität und der Partikelaufnahme</b> .....	<b>77</b>
3.1.1 Partikeltoxizität .....	77
3.1.1.1 Evaluierung eines MTT-Assays zur Untersuchung der Partikeltoxizität in Suspensionszellkulturen .....	77
3.1.1.2 Vergleich verschiedener zelltoxikologischer Messmethoden zur Bestimmung der DQ12 Zelltoxizität in NR8383 Zellen .....	81
3.1.1.3 Bestimmung der Zelltoxizität verschiedener Partikel (CB, TiO <sub>2</sub> (fein, ultrafein) und SWNT's).....	84
3.1.2 Messung der Partikelaufnahme .....	87
3.1.2.1 Evaluierung der durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung der Partikelaufnahme in NR8383 Zellen .....	87
3.1.2.2 Evaluierung des Zellsystems zur Untersuchung der Partikelaufnahme (Vergleichbarkeit der Zelllinie NR8383 mit primären Makrophagen) .....	91
3.1.2.3 Messungen der Partikelaufnahme unterschiedlicher Partikel .....	94
3.1.2.4 Messung der Aufnahme von SWNT's .....	97
<b>3.2 Rolle des Aktinzytoskeletts bei der Partikelaufnahme in Makrophagen</b> .....	<b>98</b>
3.2.1 Durchflusszytometrischen Analyse der Partikelaufnahme nach Aktininhibition ..	99
3.2.2 Immunohistochemische Untersuchung des Aktinzytoskeletts während der Partikelaufnahme .....	102
<b>3.3 Die Rolle des Fc<math>\gamma</math>RII bei der Phagozytose von Partikeln in Makrophagen</b> .....	<b>104</b>
3.3.1 Durchflusszytometrischen Analyse der Partikelaufnahme nach Inhibition verschiedener klassischer Phagozytose-Rezeptoren .....	104
3.3.1 Immunohistochemische Untersuchung möglicher an der Partikelaufnahme beteiligter Phagozytose-Rezeptoren .....	110
3.3.3 Untersuchung der Quarzphagozytose induzierten Signaltransduktionskaskade .....	112
3.3.3.1 Untersuchung des GTPasen-Aktivierungsstatus .....	112

3.3.3.1 Untersuchung der FcγR-Signaltransduktionskaskade .....	114
3.3.4 Durchflusszytometrischen Analyse der Quarzaufnahme nach Inhibition verschiedener Mediatoren der FcγR-Phagocytose-Signaltransduktionskaskade...	121
3.3.4.1 Durchflusszytometrischen Analyse des Einflusses der Tyrosin-Kinasen- Aktivität auf die Quarzaufnahme .....	121
3.3.4.1 Durchflusszytometrischen Analyse des Einflusses der GTPase Aktivität auf die Quarzaufnahme .....	122
3.3.5 Immunohistochemische Untersuchung der GTPase Rac1 während der Partikelaufnahme .....	125
<b>3.4 Bedeutung der Partikelaufnahme für die Entzündungsreaktion .....</b>	<b>126</b>
3.4.1 Die DQ12 induzierte Entzündungsantwort in NR8383 Zellen .....	126
3.4.1.1 Die DQ12 induzierte ROS Generierung .....	126
3.4.1.2 Die DQ12 induzierte Aktivierung des NF-κB-Signalweges .....	129
3.4.1.3 Die DQ12 induzierte Freisetzung von TNF-α .....	131
3.4.2 Rolle des Aktinzytoskeletts in der pro-inflammatorischen Reaktion auf DQ12 NR8383 Zellen .....	133
3.4.2.1 Die Rolle des Aktins in der DQ12-induzierten ROS-Generierung .....	133
3.4.2.2 Die Rolle des Aktins in der DQ12 induzierte Freisetzung von TNF-α .....	137
3.4.3 Rolle des FcγRII in der Partikelinduzierten Entzündungsreaktion in NR8383 Zellen .....	139
3.4.3.1 Die Rolle des FcγRII in der DQ12 induzierte ROS Generierung .....	139
3.4.3.2 Die Rolle des FcγRII in der DQ12 induzierte Freisetzung von TNF-α .....	140
<b>4.Diskussion .....</b>	<b>143</b>
<b>4.1 Biologische Relevanz der Modellpartikel (DQ12, CB, TiO<sub>2</sub>, SWNT's) und der         Partikeldosis .....</b>	<b>143</b>
4.1.1 Modellpartikel-Relevanz .....	143
4.1.2 Partikeldosis-Relevanz .....	147
<b>4.2 Partikeltoxizität. Toxikologische Betrachtung der Partikeleigenschaften .....</b>	<b>149</b>
<b>4.3 Die Partikelaufnahme unter Betrachtung der Heterogenität         unterschiedlicher Makrophagenpopulationen und Partikeltypen .....</b>	<b>154</b>
4.3.1 DQ12-Partikel-Aufnahme in primären AM und IM sowie in NR8383 Zellen. <i>Heterogenität der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen</i> .....	154
4.3.2 DQ12-Partikel-Aufnahme in primären alveolaren Makrophagen isoliert von Tieren unterschiedlichen Alters. <i>Heterogenität des Alters</i> .....	155
4.3.3 Aufnahme von Partikeln mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Parametern in NR8383 Zellen. <i>Biologische Relevanz der Partikeleigenschaften</i> ...	156

4.3.4 Aktinabhängigkeit der Aufnahme von Partikeln mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Parametern .....	159
<b>4.4 Phagozytotischer Mechanismus der DQ12-Aufnahme .....</b>	<b>164</b>
<b>4.5 Pro-inflammatorische Antwort auf die DQ12-Exposition. Untersuchung der DQ12-induzierten ROS-Generierung und TNF-<math>\alpha</math>-Freisetzung .....</b>	<b>171</b>
<b>4.6 Ist die DQ12-Phagozytose Fc<math>\gamma</math>RII vermittelt? Eine abschließende Diskussion der DQ12-Phagozytose .....</b>	<b>176</b>
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>181</b>
<b>6. Referenzen .....</b>	<b>185</b>

**Kurzfassung**

**Lebenslauf**

**Veröffentlichungen**

**Zur Geschichte der Entdeckung der Phagozytose**

***Danksagung***



---

**Abkürzungen**

AL	Aluminium Lactat
AM	Alveolare Makrophagen
AP-1	Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
BAL	Broncho-Alveolar-Lavage
BSA	Bovine Serum Albumin
BSS	Balanced Salt solution
CAP's	Concentrated Ambient Particles
CB	Carbon Black
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CR	Komplement-Rezeptor
Cyt-D	Cytochalasin-D
CRD	Carbohydrate recognition domain
DEP	Diesel Exhaust Particles
DHR	Dihydrorhodamin
DMEM	Dulbeccos modified Medium
DMPO	5, 5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxid
DMSO	Dimethylsufoxid
DQ12	Dörentrapper Quarz
EDTA	Ethyldiamin-N, N, N', N',-tetraessigsäure
ERK	Extrazellular Signal regulated Kinase
ESR	Elektronen Spin Resonanz
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
Fc-R	Fc-Rezeptor
FSC	Forward Light Scatter Angle
GAP	GTPase-activating protein
GEF	Guanine Exchange Factor
GST	Gluthathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethansulfonsäure
HBSS	Hank's Buffered Saline Solution
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IM	Interstitielle Makrophagen
ITAM	Immunglobulin-Tyrosine-Activation Motif
ITIM	Immunglobulin-Tyrosine-Inhibitory Motif

## Abkürzungen

---

LDH	Lactat Dehydrogenase
MARCO	Makrophagen Rezeptor mit (C)Kollagener Struktur
M- $\alpha$ -D-MP	Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside
MIP-2	Makrophage Inflammatory Protein-2
MR	Mannose Rezeptor
MTT	[3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Dimetyltetrazolium Bromid]
MTS	[3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 5-(3-Carboxymethoxyphenyl-2H-tetrazolium]
NF $\kappa$ B	Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor- $\kappa$ B
NIR	Nah-InfraRot
Nox	NADPH-Oxidase
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein-Kinase C
PI3K	Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase
PIM	Pulmonale Intravaskuläre Makrophagen
PM	Particulate Matter
PMA	Phorbol-12-Myristol-13-acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
Poly-I	Polyinosinic Acid
PSP	Poorly Soluble Particles
PTK	Protein-Tyrosin-Kinasen
PVNO	Polyvinyl-N-Oxide
RBD	Ras Binding Domain
ROFA	Residual Oil Fly Ash
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ScR	Scavenger-Rezeptor
SH2-Domäne	src-homologe Gruppe 2
SP-A	Surfactant-Protein-A
Src	Sarcoma
SSC	Side Light Scatter Angle
SWNT's	Single Walled NanoTubes

---

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
U	Units
UAPM	Urban Ambient Particulate Matter
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

---

## Kapitel 1: Einleitung

### 1.1 Inhalierbare Partikel und ihre Bedeutung in der Pathogenese von Lungenerkrankungen

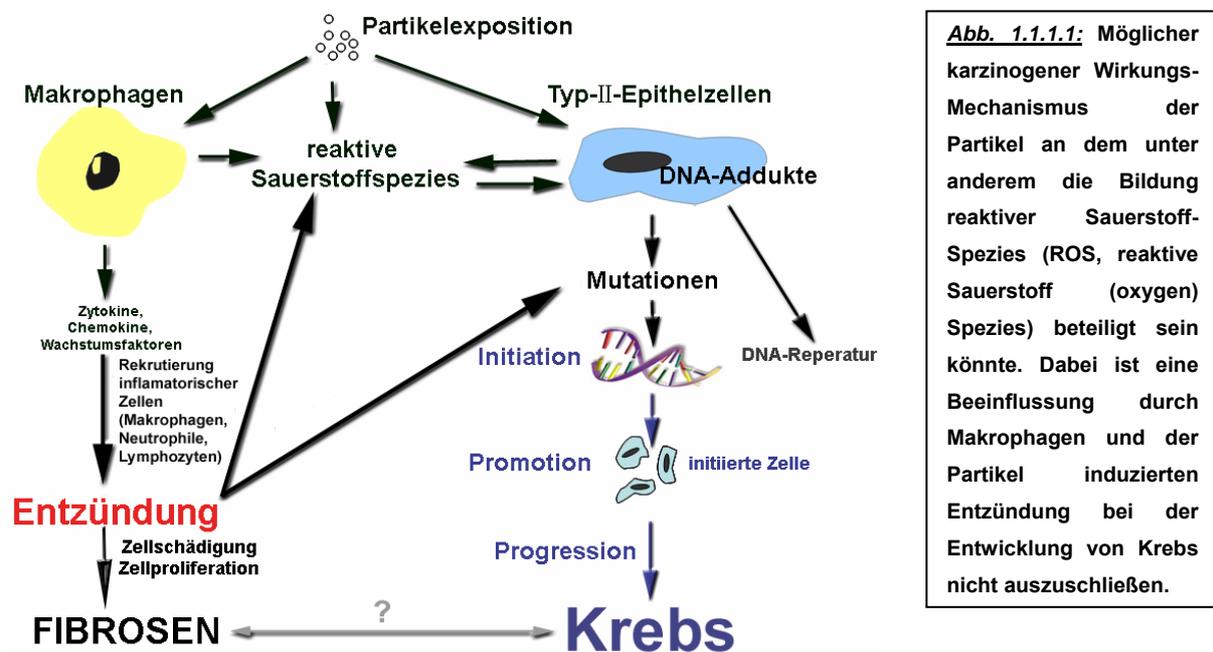
Nach dem Inkrafttreten der EU-Richtlinie für Feinstaubbelastungen rücken Partikel inhalierbarer Größe immer mehr in das Bewusstsein der Öffentlichkeit. Zahlreiche epidemiologische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Herz-Lungenkrankheiten und der Exposition zu inhalierbaren Umweltpartikel zeigen (Kappos et al. 2004; Braga et al. 2000, Zanobetti et al. 2000). Umweltpartikel oder PM (Particulate Matter) sind eine komplexe Mischung aus organischen Komponenten, Metallen, Erde oder Staub, Säuren und Allergenen, die z.B. durch Verbrennung fossiler Brennstoffe, Bauarbeiten und bei industriellen Prozesse wie in der Stahlindustrie oder im Bergbau entstehen. Sie bestehen daher aus Fraktionen mit sehr unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften zu denen unter anderem auch die in dieser Studie eingesetzten schwerlöslichen Partikelfraktionen (PSP's, poorly soluble particulates) gehören.

#### 1.1.1 Partikelinduzierte pneumonale Gesundheitsrisiken

Durch die Disposition der Partikeln in die Lunge können zahlreiche akute und chronische Atemwegserkrankungen hervorgerufen werden. Weit verbreitet ist das Auftreten fibrotischer Lungenerkrankungen wie z.B. Pneumokoniose oder Silikose, die nach der Inhalation von Kohlen- oder Silikatstäuben auftreten können (Castranova 2000). Ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Risiko für COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) und Pneumonia Infektionen konnte für die Exposition zu der PM<sub>10</sub>-Fraktion gezeigt werden (Schwarz 1994). Eine weitere epidemiologische Studie ergab eine Verbindung zwischen der Partikelbelastung und der Lungenkrebsrate (Pope et al. 2002).

Mechanistisch ist das karzinogene Potential, welches von der Partikelexposition ausgeht, noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch ein Wirkungsmechanismus über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reaktive oxygener Spezies) und der Partikel induzierten Entzündung unter Beteiligung von Makrophagen diskutiert (*Abb. 1.1.1.1*). Eine *in vitro* Exposition von RLE Zellen (imortalisierte alveolaren Epithelzellen der Rattenlunge) zu Umweltpartikeln konnte eine Verbindung zwischen der Generierung von Hydroxylradikalen sowie der Bildung von 8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanine) zeigen (Knaapen et al. 2000). *In vivo* führt eine Exposition von Mäusen zu DEP's (Diesel Exhaust Particles) zur Ausbildung von Lungentumoren, die mit dem Auftreten von 8-OHdG korreliert und in Zusammenhang mit der Generierung von ROS steht (Sagai et al. 2000). Die DNA-Modifikation (8-OHdG) wird als Indikator für oxidative DNA-Schädigungen angesehen, die Veränderungen krebsinduzierender Gene verursacht (Floyd 1990, Kasai und Nishimura 1991). Als verantwortlich für die karzinogene Wirkung der PM's oder der DEP's werden die darin

enthaltenen chemischen Komponenten (z.B. PAH, Polyaromatische Hydrokarbone) mit bekanntem krebserregende Potential postuliert. Jedoch ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass die Partikel selbst Krebs verursachen können (Harrison et al. 2004). Dies zeigen auch verschiedene Studien mit TiO<sub>2</sub> (Titandioxid) und CB (Carbon Black), die keine PAH's enthalten und dennoch die Bildung von Lungentumoren in Ratten fördern (Gallagher et al. 1994, Nikula et al. 1995). Eine weitere Tierstudie in Ratten konnte einen Zusammenhang zwischen der Entzündung und der Tumorgenerierung für verschiedene Kohlenstäube, DQ12 Quarz und feinem TiO<sub>2</sub> darstellen. Dabei ist die Art des eingesetzten Partikels entscheidend für die Pathogenität. Während nach der Exposition zu Quarz und ultra-feinem TiO<sub>2</sub> eine hohe Tumorrare ermittelt werden konnte, zeigte die Belastung der Tiere mit Kohlengrubenstaub und feinem TiO<sub>2</sub> eine etwa um die Hälfte verringerte Tumorbildung (Borm et al. 2000).



In weiteren Studien unter Verwendung von Quarzpartikeln mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen (PVNO, Polyvinylpyridine-N-Oxid; AL, Aluminiumlactat) konnten Zusammenhänge zwischen der Oberflächeneigenschaft des Quarzes und der ROS Generierung sowie der DNA-Schädigung gezeigt werden (Knaapen et al. 2002, Schins et al. 2002). Die Partikeleigenschaften (z.B. die Oberflächenstruktur, Größe) scheinen somit einen entscheidenden Einfluss auf das, mit der Exposition zu den Partikeln verbundenem Gesundheitsrisiko, wie dem Tumorrisiko, zu haben.

Da in dieser Studie hauptsächlich DQ12 (Dörentrupe Quarz), ein feiner Quarzpartikel, eingesetzt wird, soll in den folgenden Abschnitten besonders auf die pathogene Bedeutung inhalierbarer, kristalliner Silikatpartikel eingegangen werden.

---

### 1.1.2 Quarzstäube und Silikose

Vor allem aus der Arbeitsmedizin sind die gesundheitlichen Risiken, die von Silikat- und Kohlenstäube ausgehen bekannt. Sie werden als die Auslöser von fibrotischen Lungenkrankheiten wie Pneumokoniose oder Silikose beschrieben, die mit der Entwicklung von Krebs in Verbindung gebracht werden. Die bei Bergarbeitern auftretende, mit der Inhalation von Kohlenstaub in Verbindung gebrachte Pneumokoniose wird je nach Fortschritt der Krankheit in einfache und komplizierte Pneumokoniose unterteilt. Die Akkumulation des Kohlenstaubs in der Lunge führt zur Ausbildung kleiner Knötchen (Granulomen), die besonders in Bifukationen der Bronchien zu finden sind. Sie bestehen aus Kohlenstaub gefüllten Makrophagen und kollagenen Fasern. Durch eine anhaltende Partikelbelastung wachsen diese an und bewirken im Endstadium (komplizierte Pneumokoniose) eine Verstopfung und irreversible Schädigung der Lunge (Castranova 2000). Kohlenstaub kann jedoch immer auch Silikate enthalten, sodass die Effekte auf beide Komponenten zurückgeführt werden müssen. Eine Studie an Bergleuten konnte einen direkten Zusammenhang zwischen der Quarzkonzentration im Kohlenstaub und dem Auftreten einer pulmonalen Entzündung, dem möglichen Initiator der Silikose, aufzeigen (Kuempel et al. 2003). Eine arbeitsplatzbedingte Quarzexposition, wie sie z.B. im Berg- oder Tunnelbau sowie bei Gußputzern oder Sandstrahlern aber auch bei Arbeitern in feinkeramischen Betrieben und Dentallaboren auftritt, kann über eine chronische Entzündung bis zur Silikose führen (Merkblatt zur Berufsmedizin vom Institut für Arbeitsmedizin, Nr. 4101).

Silikose, wird durch die Inhalation und Ablagerung von Silikaten oder silikathaltigen Stäuben, wie Kohlenpartikel, in der Lunge verursacht. Je nach klinischem und pathologischem Krankheitsbild unterscheidet man zwischen einfacher (nodularer) und akuter Silikose, sowie progressiver und diffuser interstitieller Fibrose. Während bei der einfachen (nodularen) Silikose einzelne, kleine, harte Knötchen von bis zu 1cm Größe - mikroskopisch aufzulösen als, um eine zentrale Kollagenregion angeordnete Aggregate aus Partikel beladenen Makrophagen- auftreten, sind die Knötchen bei der progressiven Fibrose größer als 1cm. Bei dieser weiter fortgeschrittenen Pneumokoniose werden das Lungenparenchym sowie die Bronchiolen und Blutgefäße angegriffen. Die sich nach einer Exposition zu hohen Silikatkonzentrationen entwickelnde akute Silikose zeichnet sich durch Lungenödeme und eine interstitielle Entzündung aus. Des Weiteren sammelt sich in den Alveolen ein proteinreicher Surfactant an (Rimal et al. 2005). Silikatinduzierte Fibrosen entwickelt sich über 2 Phasen, wie in verschiedenen Tierstudien gezeigt werden konnte. In der ersten Phase ist eine Entzündungsreaktion zu verfolgen. Durch den quarzinduzierten Einstrom von alveolaren Makrophagen (AM) in die Lunge und deren Aktivierung wird die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen erhöht und die Aktivität sowohl des humoralen als auch des zellulären Immunsystem hoch reguliert. Des Weiteren werden durch Makrophagen

Silikatpartikel aus der Lunge in andere lymphatische Gewebe, wie den Lymphknoten oder der Milz transportiert. Fibrotische Veränderungen in der Lunge treten in diesem Stadium jedoch noch nicht auf. In der zweiten Phase regelt sich der Aktivierungsstatus des adaptiven Immunsystems wieder auf ein normales Niveau ein, während es zur Ausbildung einer massiven Entzündungsreaktion, unter dem Einstrom von Neutrophilen und Lymphozyten, kommt. In diesem Stadium treten massive Zellschädigungen - LDH- und Protein-Konzentration in BAL-Flüssigkeit steigt- auf und Lungengranulome bilden sich aus. Es kommt zur Ausbildung der Fibrose (Castranova et al. 2000, Langley et al. 2004, Porter et al. 2004, Albrecht et al. 2004).

Die genauen molekularen Mechanismen, die zur Entwicklung einer Silikose führen, sind noch nicht völlig geklärt. Es wird jedoch ein Mechanismus über die Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie der Bildung von ROS unter der Aktivierung des Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) diskutiert. Die inhalierten Silikatpartikel werden dabei von Makrophagen, den Initiatoren des Immunsystems erkannt und aufgenommen. Die nun aktivierten Makrophagen setzen Zytokine wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) frei, die wiederum die Aktivierung von Fibroblasten und dendritischen Zellen induzieren. So wird das adaptive Immunsystem aktiviert und die Fibroblastenproliferation sowie die Kollagensynthese stimuliert. Durch eine wechselseitige Einwirkung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems kommt es zur Ausbildung der Fibrose (Pernis 2005). Bei der Progression der Silikose scheint jedoch, neben der induzierenden Wirkung auf die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren, auch die Zelltoxizität des Quarzes entscheidend beteiligt zu sein. Die verstärkte Aufnahme des Silikats kann zum Absterben der Makrophagen führen, wodurch dieses wieder freigesetzt wird. Wieder freigesetzte Quarzpartikel sowie die Zelltrümmer der abgestorbenen Makrophagen können erneut von nachfolgenden Makrophagen aufgenommen werden, was zur erneuten Makrophagenaktivierung führt (Rimal 2005). Eine weitere Welle entzündungsfördernder Prozesse wird eingeleitet, sodass ein sich wiederholender Kreislauf in Gang gesetzt wird, der die Wirkung des inhalierten Silikats verstärkt. Die pathogene Wirkung von Quarz wird also durch eine komplexe Verschachtelung verschiedener biologischer, partikelinduzierter Prozesse hervorgerufen:

1. Direkte Toxizität der Quarzpartikel auf Lungenzellen, wie Makrophagen aber auch Lungenepithelzellen, die zur durch Zerstörung des Lungengewebe führt.
2. Die Bildung von ROS durch die Partikel selbst oder partikelinduziert durch AM oder polymorphkernige Neutrophile (PMN), welche Lipidoxidationen und Proteinnitrosationen hervorrufen können, die zur Schädigung des Lungengewebes führen.

3. Aktivierung von AM, die pro-inflammatorische Chemokine und Zytokine freisetzen, wodurch inflammatorische Zellen (Makrophagen, PMN) aus der Blutbahn in die Lunge rekrutiert und aktiviert werden. Dadurch wird ein Circulus vitiosus angeregt, der die Endzündung immer mehr antreibt.
4. Zusätzlich stimuliert die Sekretion von Wachstumsfaktoren durch AM und alveolare Epithelzellen z.B. die Fibroblastenproliferation und die Kollagensynthese, wodurch es zur Ausbildung einer Fibrose kommt (Castranova et al. 2000).

Die Silikoseprogression ist also ein komplexer Prozess bei dem, wie auch bei anderen partikelinduzierten Lungenerkrankungen, die Wechselwirkung der Partikel mit AM eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Daher soll in dieser Studie die Interaktion zwischen AM und PSP's verschiedener Größe untersucht werden.

### **1.1.3 Mechanismus der partikelinduzierte Entzündungsreaktionen**

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, spielen AM in der Initiation und Progression der Silikose eine entscheidende Rolle, wobei die Entwicklung einer chronischen Entzündung von wesentlicher Bedeutung ist. Doch auch allgemein ist für die gesundheitsschädlichen Risiken der Partikelexposition die Ausbildung einer akuten Entzündung, deren Progression zu einem chronischen Krankheitsbild führen kann, beschrieben, woran AM als Quelle der inflammatorischen Mediatoren beteiligt sind. Dabei spielt besonders die Generierung von ROS sowie die Bildung und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Proteinen (Zytokine, Chemokinen und Wachstumsfaktoren) eine entscheidende Rolle.

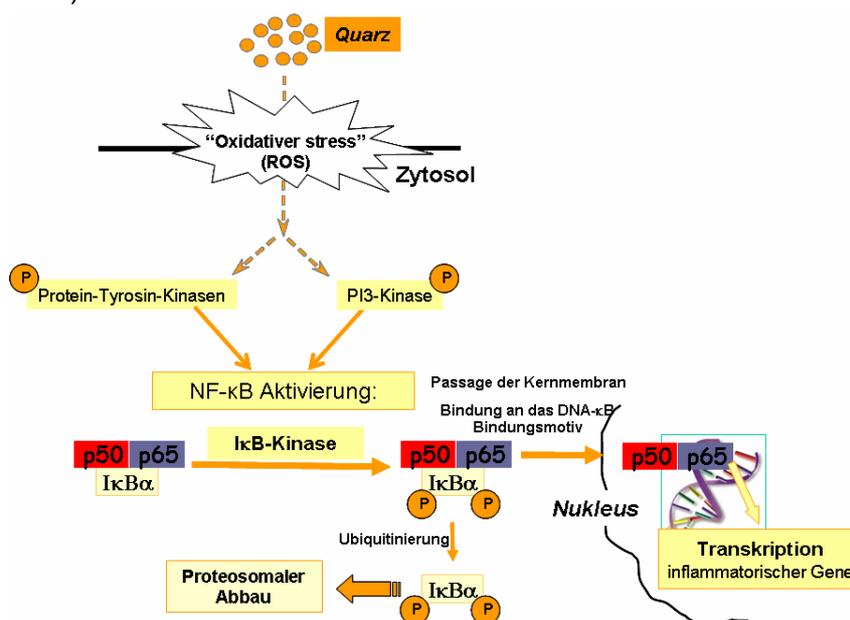
Eine partikelinduzierte ROS Bildung wurde für viele Partikel unterschiedlichen Typs in AM und anderen Zelltypen gezeigt (Goldsmith 1997, Imrich et al. 1999, Knaapen et al. 2002). Da in dieser Studie jedoch hauptsächlich auf die Untersuchung der Pathogenität von Quarzpartikeln eingegangen wird, soll im Folgenden besonders auf die Quarz induzierten inflammatorischen Reaktionen eingegangen werden. Die Generierung von ROS kann direkt durch die Wechselwirkung des Quarzes mit dem wässrigen Umgebungsmilieu der Lunge oder indirekt über die Aktivierung von Phagozyten wie Makrophagen erfolgen (Ding et al. 2002). In der Natur kommen Silikate, die hauptsächlich aus Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) bestehen, als amorphe (lösliche) oder als kristalline (schwerlösliche) Minerale in 7 bekannten Formen vor. Quarz stellt dabei eine dieser kristallinen Formen dar (Ross et al. 1993). Quarze zeichnen sich durch ihre hochreaktive Oberfläche aus Silizium- und Siliziumoxidradikalen aus, welche in wässrigen Medien zu Hydroxylradikalen ( $\text{OH}^\cdot$ ) reagieren. Frisch gebrochener Quarz hat dabei eine Halbwertszeit von 20h. Das Redoxpotential der Quarzoberfläche nimmt also mit der Zeit ab, wodurch er sein Potential in AM oxidativen Stress zu induzieren verliert. Dabei nimmt gleichzeitig die Zelltoxizität des Quarzes ab (Vallyathan et al. 1988). Die inflammatorische Wirkung und der toxische Charakter der Quarzpartikel stehen im Zusammenhang mit dem hohen Redoxpotential der Mineraloberfläche, wie andere Studien

mit PVNO- und/oder AL-Oberflächenmodifikationen, die die reaktive Oberfläche abdecken, bestätigen (Duffin et al. 2001, Albrecht et al. 2004). Jedoch scheint diese keine hinreichende Erklärung für die Pathogenität der Quarzpartikel zu sein, wie ein Tierversuch mit frisch gebrochenem im Vergleich zu gealtertem Quarz zeigt. So induzieren frisch gebrochene Quarzpartikel im Vergleich zu gealterten zwar eine verstärkte ROS Bildung durch AM, doch konnten keine Unterschiede in der inflammatorischen Wirkung zwischen beiden Altersfraktionen beobachtet werden (Porter et al. 2002). Des Weiteren zeigte eine Untersuchung von 3 unterschiedlichen Quarzpartikeln (DQ12 und zwei weitere Arbeitsplatzquarzpartikeln) ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Potential der Hydroxylradikalbildung und der inflammatorischen Wirkung (Clouter et al. 2001). In einem anderen Untersuchungsansatz mit Radikalfängern konnte wiederum gezeigt werden, dass die ROS Bildung im direkten Zusammenhang mit der TNF- $\alpha$ -Produktion steht. Radikalfänger senken die ROS Freisetzung durch Makrophagen, wodurch die TNF- $\alpha$ -Bildung vermindert und die inflammatorische Wirkung des Quarzes reduziert wird (Gossart et al. 1996).

TNF- $\alpha$  ist sowohl bei der Entwicklung der Silikose als auch bei der Ausbildung von Entzündungen ein Schlüsselzytokin. In verschiedenen Studien konnte ein direktes Verhältnis zwischen der TNF- $\alpha$ -Produktion und der Progression der Entzündung gezeigt werden (Driscoll et al. 1997, Barbarin et al. 2005). Dabei ist TNF- $\alpha$  nicht nur für die Aktivierung des Immunsystems, sondern auch für die Kollagendisposition während der Fibroseausbildung entscheidend (Piguet et al. 1990). Quarz induziert jedoch auch die Bildung und Freisetzung anderer Entzündungsmediatoren. So konnte, in einer umfassenden Studie der Expression immunregulatorischer Gene an AM, 4h nach einer Quarzbelastung *in vivo* wie *in vitro* die Hochregulierung von IL-6, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) und MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) demonstriert werden. Bei der *in vitro* Belastung war zusätzlich die Expression von IL-1, IL-10, iNOS (induzierende Nitric Oxid Synthetase) und GM-CSF (Granulocyte / Macrophage Colony Stimulating Factor) zu beobachten. Eine Kocultivierung mit Typ-II-Epithelzellen hatte keine Veränderung des Expressionsmuster zur Folge (Rao et al. 2004). Ebenso wird in RAW 264.7 Makrophagen durch eine Quarzbelastung eine dosisabhängige Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6 unter Quarzpartikel Aufnahme induziert (Balduzzi et al. 2004). Einen ähnlichen dosisabhängigen Effekt auf die Transkription und Translation des Zytokins (TNF- $\alpha$ ) zeigt auch eine 4h *in vitro* Belastung primärer Makrophagen mit ultra-feinem CB. Dabei ist die TNF- $\alpha$  Expression und Freisetzung sowohl vom  $Ca^{2+}$ -Spiegel als auch vom Oxidationsstatus der Zelle abhängig. Des Weiteren werden durch die CB Belastung die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 (Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1) aktiviert (Brown et al. 2004). Daraus ergibt sich eine Abhängigkeit der quarzinduzierten TNF- $\alpha$  Bildung von der Aktivierung des NF- $\kappa$ B (Rojanasaku et al. 1999). Die Quarz-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung konnte auch *in situ* an

Luziferase Reporter Mäusen gezeigt werden. Die Exposition zu Quarz erhöht die Immunreaktivität des NF- $\kappa$ B-Luziferaseproteins in Makrophagen sowie bronchialen Epithelzellen, wohingegen eine TiO<sub>2</sub> Exposition keinen Effekt zeigt. Parallel dazu wurde im Lungenhomogenat eine verstärkte Transkription der TNF- $\alpha$ -, MIP-2-, MCP-1-, Interferon- $\gamma$ -, sowie der Interleukine IL-6- und IL2-mRNA nachgewiesen (Hubbard et al. 2002). Die Quarz induzierte Signaltransduktionskaskade unter der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 wiederum ist von der ROS Bildung abhängig (Kang et al. 2000, Gwinn 2006).

Der nukleare Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird mit vielen Krankheiten, wie Atherosklerosis, Typ-II-Diabetis, Asthma und Krebs in Verbindung gebracht. Bei der Ausbildung von Entzündungen ist NF- $\kappa$ B ein Schlüsselfaktor, da durch dieses Protein die Expression vieler inflammatorischer Gene kontrolliert wird (Baldwin 2001, Tak und Firestein 2001, Ben-Neriah und Schmitz 2004). Eine Aktivierung kann dabei über verschiedene Wege erfolgen. So können z.B. TNF- $\alpha$  selbst, über den TNF-Rezeptor (TNFR), oder bakterielle Produkte, über den Toll-like-Rezeptor (TLR), als aktivierender Stimulus wirken (Ben-Neriah und Schmitz 2004). Bei der ROS abhängigen, quarzinduzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung sind Phosphorylierungen verschiedener Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK), wie im speziellen der PI3-Kinase (PI3K), nötig. Bei der Aktivierung dissoziiert der meist als Heterodimer aus einer p50 und p65 bestehende NF- $\kappa$ B von der phosphorylierten inhibitorische Einheit I $\kappa$ B- $\alpha$ . Das verbliebene p65-p50 Dimer kann die Kernmembran passieren und sich an die DNA-Promotoreregionen der NF- $\kappa$ B kontrollierten, inflammatorischen Gene anlagern. Dadurch wird die Transkription dieser ermöglicht, welche dann in der Translation in die entsprechenden inflammatorischen Proteine umgesetzt werden. Die im Zytosol verbliebene dissoziierte inhibitorische Einheit I $\kappa$ B- $\alpha$  wird nach Ubiquitinierung proteasomal abgebaut (Castranova 2004, *Abb. 1.1.3.1*).



**Abb. 1.1.3.1:** NF- $\kappa$ B Aktivierung (verändert nach Castranova 2004).

Die Partikelexposition von Makrophagen führt jedoch auch zu anderen Effekten, die sich auf die Induktion der Entzündungsreaktion auswirken können. So wirkt sich z.B. eine Partikelbelastung auf die Phagozytosekapazität von Makrophagen aus. In einer umfassenden Untersuchung der Aufnahme von Latexbeads ( $\varnothing = 2\mu\text{m}$ ) in J774.2 Makrophagen wurde gezeigt, dass sowohl eine Vorbelastung mit feinem oder ultrafeinem  $\text{TiO}_2$  wie auch mit CB die Anzahl der Zellen, die Latexbeads aufgenommen haben, dosisabhängig herabsetzt. Dabei hat die Aufnahme von CB oder  $\text{TiO}_2$ -Partikel eine inhibitorische Wirkung auf eine nachfolgende Latexbeadphagozytose. Die Vorinkubation mit ultra-feinem CB führte sogar zu einer völligen Unterdrückung der Phagozytose, sodass weder CB-Partikel noch Latexbeads aufgenommen wurden (Renwick et al. 2001). Eine andere Studie konnte zeigen, dass in primären alveolaren Makrophagen (AM), sowohl die Anzahl von gebundenen wie aufgenommenen Fluorescein markierten Silikatpartikeln, durch eine vorherige Belastung und Aufnahme von aggregierten ultra-feinen CB Partikeln herabgesetzt wird (Lundborg et al. 1999). Auch die Pre-Exposition mit  $\text{PM}_{10}$  führt zu einer Verminderung der Phagozytoserate, was für die Aufnahme von inerten Melamin-Partikeln gezeigt wurde (Monn et al. 2002). Die *in vitro* Belastung humaner primärer Makrophagen mit groben (coarse, 2,5-10 $\mu\text{m}$ ) sowie feinen (0,1-2,5 $\mu\text{m}$ ) PM-Fractionen über 18h setzt die anschließende Phagozytosekapazität sowohl für unopsonierte als auch für opsonierte Zymosanpartikel herab. Des Weiteren konnte in dieser Studie eine verminderte Komplement-Rezeptor (CD11b) Expression nach der Exposition der primären Makrophagen zu beiden Fractionen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte eine Belastung mit einer ultra-feinen Fraction weder zu einer signifikanten Reduktion der CD11b Expression noch zu einer Verminderung der Zymosanpartikelphagozytose (Becker und Soukup 2003). Des Weiteren wird durch die Exposition zu Umweltpartikel, wie  $\text{PM}_{10}$ , zusätzlich zur Senkung der Phagozytoserate von *Saccharomyces Cerevisiae*, die durch die Hefen induzierte ROS Generierung herabgesetzt (Becker und Soukup 1998). Auch die Belastung mit Quarz senkt die Phagozytosekapazität. Die *in vivo* Exposition von Affen zu DQ12 (26 Monate, 5Tage/Woche, 8h/Tag mit 5mg/m<sup>3</sup>) vermindert die *in vitro* Phagozytose fluoreszierender Polystyrenmikrosphären in primären AM 20 Monate nach der Exposition (Hildemann et al. 1992). Neben dem Einfluss auf die Phagozytosekapazität zeigt eine Partikelbelastung noch weitere Effekte, die mit der Herabsetzung der Makrophagenfunktion der Lunge einhergehen. So vermindert z.B. die Exposition zu DEP sowohl die Lipopolysaccharide (LPS)- als auch die Bakterien-induzierte Bildung von ROS sowie von Zytokinen, wie  $\text{TNF-}\alpha$  (Siegel et al. 2004). Partikel haben somit ein immunmodulatorisches Potential, welches die Immunabwehr besonders durch Makrophagen herabsetzt.

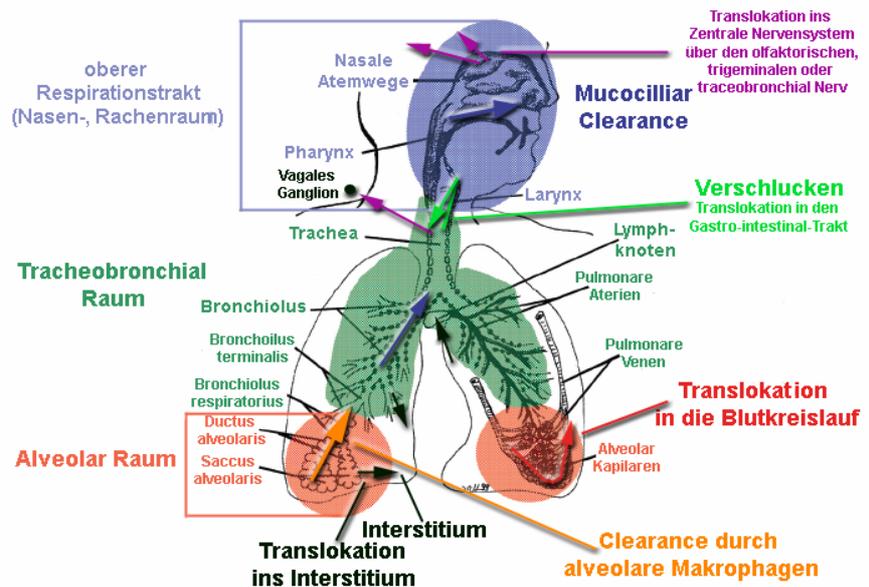
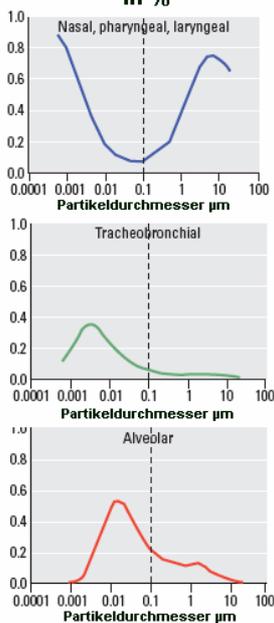
AM sind maßgeblich an der Eliminierung von Pathogenen aus der Lunge, sowie an der Immuninitiation und der Immunregulation beteiligt, wodurch sie unter anderem die Entzündungsreaktion modulieren. Dies sind auch die entscheidenden Kriterien in der Entwicklung partikelinduzierter Lungenerkrankungen. Insbesondere die Partikelaufnahme sowie der Partikel induzierte pro-inflammatorische Stimulus durch die AM scheinen bei der Progression der Silikose und anderer Lungenerkrankungen wie COPD, Asthma oder Lungenkrebs wichtig zu sein. Die molekularen Mechanismen welche die partikelverursachte Entzündung stimulieren und der Bezug zur Partikelaufnahme durch AM ist, besonders für ultra-feine Partikel, noch weitgehend unbekannt. Daher soll in dieser Studie der Partikelaufnahmemechanismus und die daraus resultierende Reaktion der AM untersucht werden.

#### **1.1.4 Die Partikelgröße, ein entscheidender Faktor**

Inhalierbare Partikel werden anhand ihrer Größe (aerodynamischer Durchmesser,  $\emptyset$ ) klassifiziert, welche in direktem Verhältnis zu ihren Ausbreitungs- und Eliminierungsmöglichkeiten im menschlichen Körper und ihrem potentiellen Gesundheitsrisiko stehen. Grobe Partikel (coarse,  $\emptyset > 5\mu\text{m}$ , z.B.  $\text{PM}_{10}$ ) können nur in den oberen Respirationstrakt (Nasen- und Rachenraum) gelangen und durch Ausatmen, Verschlucken oder mucocilliarer Clearance eliminiert werden. Die respirablen Partikel ( $\emptyset < 5\mu\text{m}$ ) werden des Weiteren in eine feine ( $\emptyset = 0,1\text{-}2,5\mu\text{m}$ , z.B.  $\text{PM}_{2,5}$ ) und eine ultra-feine ( $\emptyset \leq 0,1\mu\text{m}$ ) Partikelfraktion eingeteilt. Sie können in den mittleren oder tiefen Teil des respiratorischen Systems bis in die Alveolen vordringen. Jedoch ist auch die Verteilungsmöglichkeit dieser Partikelfraktion im tieferen Respirationstrakt weiter von der Größe abhängig. So erreichen ultra-feine Partikel mit einem  $\emptyset$  von  $0,001\mu\text{m}$  nicht die Alveolen und auch nur 10% können in den tieferen Bronchialtrakt vordringen. Etwas größere ultra-feine Partikel ( $\emptyset$  von  $0,005\mu\text{m}$ ) dagegen können sich nach Inhalation gleichmäßig in den 3 Bereichen des Respirationstrakts ausbreiten. Die größte Transposition ( $\sim 50\%$ ) in die Alveolen erfahren ultra-feine Partikel mit einem  $\emptyset$  von  $0,020\mu\text{m}$ . Da ein chemischer Abbau der schwerlöslichen PSP's nicht möglich ist, akkumulieren sie in der Lunge oder können, von Makrophagen aufgenommen, z.B. in die Lymphknoten abtransportiert werden. Ultra-feine Partikel können zudem das Epithel oder die alveolaren Blutkapillaren passieren und ins Interstitium oder in die Blutzirkulation gelangen. Im Interstitium kann eine Partikelakkumulation interstitielle Entzündungen (wie Pneumokoniose) hervorrufen. Die in die Blutbahn gelangten Partikel können sich im gesamten Körper verteilen und z.B. Herz oder Leber erreichen. Ultra-feine (UFP's, Ultra-Fine Particles) oder Nanopartikel (NSP's, NanoSizedParticles), wie sie heute infolge der Entwicklung der Nanotechnologie bezeichnet werden, können des Weiteren z.B. über den olfaktorischen Nerv ins Gehirn gelangen (Ferin et al 1992, Tao et al. 2003, Oberdörster et al. 2005, *Abb. 1.1.4.1*). Doch wird die

Translokalisierung von ultra-feinen Partikeln von der Lunge in die Blutbahn durch neuere Studien in Frage gestellt. So konnte in einem *in vitro* Modell an der pulmonalen Epithelzelllinie Calu-3 gezeigt werden, dass weder Carboxyl- noch Amin-modifizierte Partikel eine Translokalisierung erfahren (Geys et al. 2005). Die Exposition von Ratten und Mäusen zu ultra-feinen CB zeigt eine starke Retention der Partikel in der Lunge (Elder et al. 2005). Des Weiteren erbrachte eine humane Studie, dass 6h nach Inhalation Technetium-99m markierte CB-Nanopartikel noch zu 95% in der Lunge zu finden sind (Mills et al. 2005).

**Regionale Partikelverteilung in %**



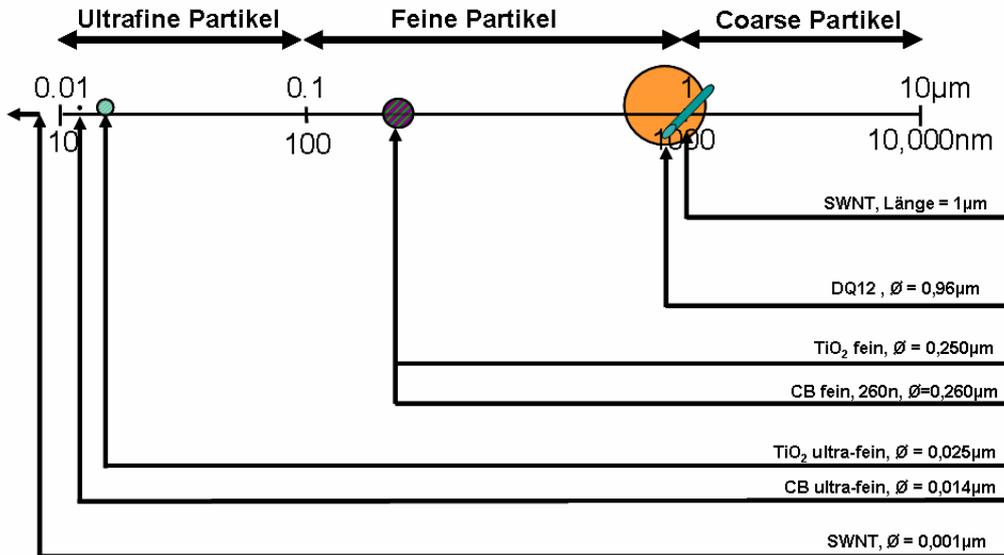
**Abb. 1.1.4.1:** Ausbreitungs- und Eliminierungsmöglichkeiten von Partikeln verschiedener Größenfraktionen im menschlichen Körper (verändert aus Oberdörster et al. 2005).

**1.1.5 Partikel der Studie**

Entscheidend für den pathogenen Charakter eines Partikels sind neben der Größe, die chemische Komposition und die chemischen und physikalischen Eigenschaften (wie der Oberflächencharakter). Expositionen zu verschiedenen Partikeln zeigen aufgrund unterschiedlicher Reaktivitäten, Eigenschaften und Wirkungsmechanismen variable Effekte. Daher wurden in dieser Studie PSP's verschiedener Größe sowie unterschiedlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften eingesetzt. Hauptsächlich verwendet wurde DQ12 (Dörentruper Quarz), ein schwerlöslicher feiner Quarzpartikeln mit einem mittleren  $\emptyset$  von 0,96 $\mu$ m. Des Weiteren erfolgten einige Untersuchungen mit CB (Carbon Black, elementarer Kohlenstoff fein, 260n,  $\emptyset = 0,260\mu$ m; ultra-fein, printex90,  $\emptyset = 0,014\mu$ m) und TiO<sub>2</sub> (Titandioxid, fein, Amatase,  $\emptyset = 0,260\mu$ m; ultra-fein, P25,  $\emptyset = 0,025\mu$ m), sowie mit

technisch hergestellten zylinderförmigen SWNT's (Single Walled Nano Tubes  $\varnothing = 0,001\mu\text{m}$ ; Länge =  $0,1\mu\text{m}$ , *Abb. 1.1.5.1*).

## Größenverteilung der Partikel



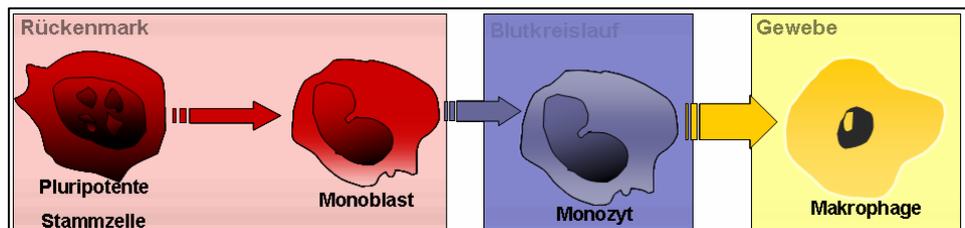
**Abb. 1.1.5.1:** Größenverteilung der in dieser Studie verwendeten Partikel zur Untersuchung der Partikelaufnahme-mechanismen an Makrophagen.

## 1.2 Abwehrmechanismen in der Lunge

Der Respirationstrakt ist dem ständigen Angriff inhalierter Partikel und Mikroorganismen ausgesetzt und weist daher ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen auf. Die erste Abwehr erfolgt im oberen Respirationstrakt durch Niesen, Husten und mucocilliar Clearance. Dringen die Partikel tiefer in die Lunge, in die Bronchien oder Alveolen, vor müssen andere Mechanismen greifen. An diesen Lokalitäten sind Phagozyten entscheidend für die Immunabwehr und die Lungen-Clearance. Für die Phagozytose in der Lunge sind vor allem polymorphkernige Leukozyten und alveolare Makrophagen (AM) zuständig. Doch auch interstitielle Makrophagen (IM) und pulmonale intravaskuläre Makrophagen (PIM) sowie dendritische Zellen unterstützen die Immunabwehr in der Lunge. Die pulmonalen Makrophagen unterscheiden sich dabei in Ursprung und der Lokalisation in der Lunge, sowie in den von ihnen exprimierten Rezeptoren, ihrer antimikrobiellen Aktivität und in den von ihnen produzierten Zytokinen (Verhoef 1991, Lohman -Matthes et al. 1994, Nicod 1999).

### 1.2.1 Makrophagen des Respirationstrakts

Makrophagen sind ubiquitär verteilte, mononukleare Phagozyten und können als die Wächter in der ersten Verteidigungsreihe der körpereigenen Immunabwehr angesehen werden. Dabei spielen sie sowohl in der akuten als auch in der chronischen Entzündung eine Schlüsselrolle. Zum einen sind sie für die Aufnahme und den Abbau von Fremdpartikeln, wie z.B. Bakterien, verantwortlich und regeln andererseits durch die Reaktion auf und die Sekretion von entzündungsfördernden Mediatoren die Immunantwort. Alle Makrophagen haben einen gemeinsamen Ursprung im Knochenmark, wo sie sich aus pluripotenten Stammzellen entwickeln. Im Knochenmark reifen sie zu Monoblasten heran, die dann, in noch nicht vollständig differenziertem Zustand, als Monozyten das Rückenmark verlassen und in den Blutkreislauf gelangen. Über den Blutstrom erreichen diese Vorläuferzellen die verschiedenen Gewebe. Dort differenzieren sie, gesteuert vom Umfeld, zum entsprechenden gewebespezifischen Makrophagentyp. In nahezu allen Geweben und Organen sind Makrophagen zu finden, deren Aufgaben auf die Lokalisierung spezialisiert sind (Fujiwara und Kobayashi 2005, Ma et al. 2003, *Abb. 1.2.1.1*).



**Abb. 1.2.1.1:** Makrophagenentwicklung aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark, die dort zu Monoblasten heranreifen das Rückenmark verlassen und als Monozyten über den Blutstrom in die verschiedenen Gewebe gelangen, wo sie zu gewebespezifischen Makrophagen differenzieren (verändert nach Fujiwara und Kobayashi 2005).

---

In der Lunge sind neben den alveolaren Makrophagen (AM) auch interstitielle Makrophagen (IM) und pulmonale intravaskuläre Makrophagen (PIM) anzutreffen. PIM sind Phagozyten in den pulmonalen Arterien, die am pulmonalen Kapilarendothelium heften und dort für die Aufnahme von Partikeln zuständig sind (Brain et al. 1999). IM sind im Interstitium zu finden, während AM in den Alveolen residieren. AM werden als bis zum Endstadium differenzierte Blutmonozyten angesehen. Dagegen gelten IM häufig als Vorläufer der vollständig differenzierten AM (Bowden und Adamson 1972, 1980, Oud Albas et al. 1983). IM haben jedoch, wie AM, die Fähigkeit zur Phagozytose und zur Sekretion verschiedener Mediatoren wie PDGF (platelet-derived growth factor), TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 (Chandler et al 1986, Brody et al. 1992, Franke-Ullmann et al 1996, Zetterberg et al 1998).

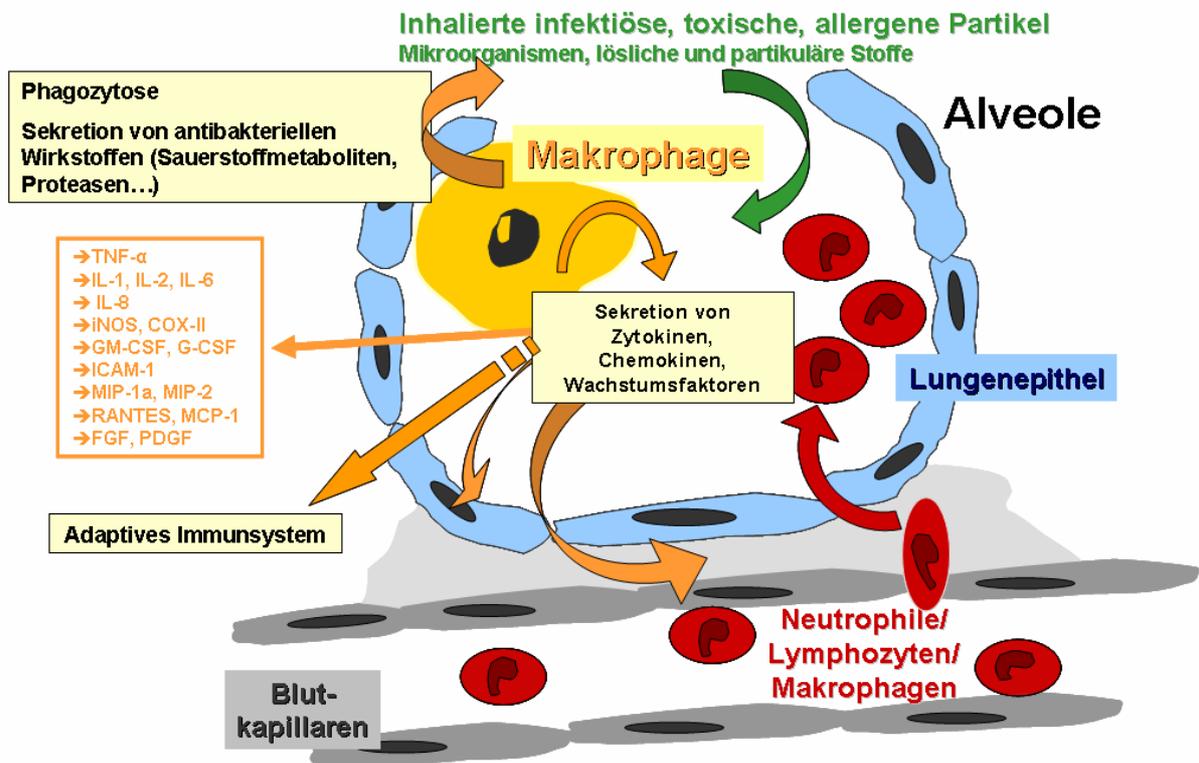
### 1.2.2 Alveolare Makrophagen

Alveolare Makrophagen (AM) sind der dominante Zelltyp, der in den Alveolen der Lunge zu finden ist. Als erste Abwehrlinie gegen inhalierte Pathogene an der Grenze zwischen alveolarem Raum und Blutstrom haben sie eine duale Funktion. Zum einen haben sie die Aufgabe die Lunge von infektiösen, toxischen oder allergenen Mikroorganismen oder Partikeln zu befreien, welche die mechanischen Barrieren des Respirationstrakts passiert haben. Die Eliminierung kann dabei extrazellulär in den Alveolen durch Sekretion antimikrobieller Stoffe (wie Sauerstoffmetaboliten, Lysozymen oder Proteasen) oder intrazellulär über Phagozytose und die Abtötung der Mikroben im Phagolysosom erfolgen. Zum anderen regulieren sie durch die Synthese und Sekretion anti- und pro-inflammatorischer Mediatoren die zelluläre alveolare Immunabwehr und koppeln die angeborene unspezifische mit der adaptiven antigen-spezifischen Immunität. Die Freisetzung von Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, oder Chemokinen, wie IL-8, führt z.B. zur Initiation der Entzündungsantwort, wobei einerseits weitere Makrophagen aktiviert und andererseits Lymphozyten, Neutrophile sowie zusätzliche Makrophagen aus der Blutbahn in die Alveolen rekrutiert und aktiviert werden. Andere von AM produzierte Zytokine, wie z.B. TGF- $\beta$  oder IL-10 dagegen wirken anti-inflammatorisch und führen zur Auflösung der Entzündung. Die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF, reguliert z.B. die Replikation und Migration von Fibroblasten. Das ebenfalls von AM sekretierte Zytokin IL-12 spielt einerseits in der zellulären Immunantwort eine wichtige Rolle und verbindet zum anderen das unspezifische angeborene (zelluläre) mit dem adaptiven antigenspezifischen (humoralen) Immunsystem (Fels und Cohn 1986, Keane und Strieter 2002, Rubins 2003, Fujiwara und Kobayashi 2005, *Abb. 1.2.2.1*).

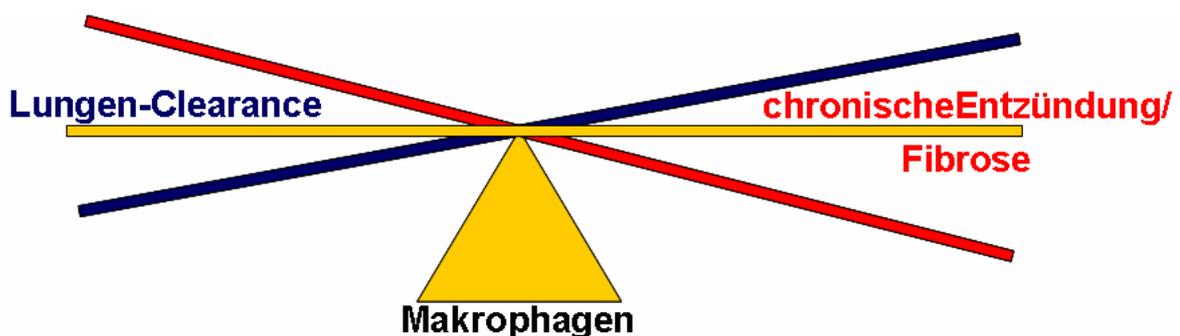
Makrophagen und die von ihnen synthetisierten und freigesetzten Stoffe sind also maßgeblich an der Regulierung, der durch inhalierte Pathogene ausgelösten Infektionen, beteiligt. Eine Überproduktion der Entzündungsmediatoren kann zu chronischen Entzündungen führen. Resultat können dann Gewebeschädigungen und Fibrosen sein

(Keane und Strieter 2002, Fujiwara und Kobayashi 2005). Die von AM gesteuerten Effekte stehen also in einer sensitiven Balance zwischen Lungen Clearance auf der einen Seite und der Entwicklung chronischer Entzündungen und Fibrose auf der anderen Seite (Abb. 1.2.2.2).

## Initiation und Regulation der Immunabwehr durch AM:



**Abb. 1.2.2.1:** Duale Funktion der alveolaren Makrophagen (AM) in den Alveolen der Lunge. Zum einen haben sie die Aufgabe der Lungen-Clearance (Befreiung von infektiösen, toxischen oder allergenen Mikroorganismen oder Partikeln durch Phagozytose oder Sekretion antimikrobieller Stoffe) und zum anderen regulieren sie durch die Synthese und Sekretion von anti- und pro-inflammatorischen Mediatoren die zelluläre alveolare adaptive antigen-spezifische Immunabwehr (verändert nach Fujiwara und Kobayashi 2005).



**Abb. 1.2.2.2:** Die AM bilden eine sensitive Balance zwischen der Lungen-Clearance einerseits und der Entwicklung chronischer Entzündungen und Fibrose auf der anderen Seite.

### 1.3 Mechanismen der Partikelaufnahme

Eine Hauptaufgabe alveolarer Makrophagen nach Exposition zu Umweltpartikeln besteht in der Entfernung von Partikeln aus der Lunge. Die Aufnahme inhalierbarer Partikel durch Makrophagen ist vielschichtig untersucht worden. So konnte in RAW 264.7 Makrophagen eine zeitabhängige DQ12 Aufnahme, die sich durch die Modifikation der DQ12 Partikeloberfläche mit PVNO erhöhte, gezeigt werden (Höhr et al. 2002). Die Gruppe um Kobzik konnte eine dosisabhängige Aufnahme für ROFA (residual oil fly ash, Flugasche) in primären Hamster AM nachweisen (Goldsmith et al. 1997). Eine ältere, umfassendere Studie der gleichen Gruppe erbrachte eine dosisabhängige TiO<sub>2</sub>-Aufnahme, die in Hamster AM im Vergleich zu monozytischen Zelllinien wie MM6 (MonoMac6) oder Epithelzellen (Mys) besonders ausgeprägt war und sich durch den Entzug von Calcium vermindern ließ (Stringer et al. 1995). Trotz zahlreicher weiterer Studien, die sich mit den Wechselwirkungen zwischen Umweltpartikeln und AM und der daraus folgenden Partikelaufnahme beschäftigen, wurden die tatsächlichen molekularen Mechanismen der Partikelaufnahme bislang noch nicht gezeigt.

#### 1.3.1 Grundlegende zelluläre Mechanismen der Stoffaufnahme

Grundsätzlich sind 3 verschiedene zelluläre Aufnahmemechanismen, abhängig von der aufzunehmenden Substanz, beschrieben. Man unterscheidet zwischen der Pinozytose, der rezeptorvermittelten Endozytose und der erstmals von Ilya Mechnikov 1893 beschriebenen klassischen Phagozytose. Die Pinozytose beschreibt die Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen durch die Ausbildung von Membraneinstülpungen in die Zelle. Das so entstandene Vesikel wird als Pinosom bezeichnet. Der Begriff Endozytose bezeichnet den vesikulären Verkehr von kleinen Molekülen wie Nährstoffen, Pathogenen, Antigenen, Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren durch die Plasmamembran. Auch bei der rezeptorvermittelten Endozytose erfolgt die Internalisierung durch Einstülpungen der Zellemembran, wobei zwischen der Clathrin-vermittelten (klassischen) und der Clathrin-unabhängigen Endozytose unterschieden wird. Die klassische Endozytose läuft über die Rekrutierung des zyttoplasmaständigen Clathrins zur Zellmembran ab. Dort entstehen Clathrin-ausgekleidete Vesikel (clathrin coated pits), die sich zum Endosom entwickeln. Bei der Clathrin-unabhängigen Endosomenausbildung wird eine Aufnahme über Lipidrafts und Caveolin favorisiert (Le Roy und Wrana 2005). Während Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose Clathrin abhängige Prozessen sind, ist die klassische Phagozytose Aktin vermittelt und meist unabhängig von Clathrin. Bei der Aktin-abhängigen Aufnahme werden Partikeln mit einer Größe > 0,5µm aktiv durch die Ausbildung von Pseudopodien umschlossen und in die Zelle gezogen (Aderem und Underhill 1999, *Abb. 1.3.1.1*). Auf den ersten Blick weisen Phagozytose und Endozytose einige Gemeinsamkeiten auf. So bilden

sich in beiden Prozessen Vesikel durch Membraneinstülpungen aus, die verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen und schließlich in der Bildung eines Phagolysosoms bzw. Lysosoms enden (Tjelle et al. 2000). Auch konnte eine Beteiligung des Aktins in der rezeptorvermittelten Endozytose in MDCK-Zellen gezeigt werden (Apodaca 2001).

Jedoch unterscheidet sich die Phagozytose in Dynamik und Komplexität stark von der Endozytose und ist im Allgemeinen durch 3 Faktoren von anderen Aufnahmeprozessen zu unterscheiden:

1. Durch die klassische Phagozytose werden Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von  $> 0,5\mu\text{m}$  aufgenommen.
  2. Die Phagozytose wird durch eine Wechselwirkung zwischen einem spezialisierten Zelloberflächenrezeptor und einem spezifischen Ligandenmotiv eingeleitet
  3. Das Aktinzytoskelett ist die treibende Kraft in diesem Prozess.
- (Kwiatkowska und Sobota 1999)

### Mögliche Aufnahmemechanismen für inhalierbare Partikel :

#### Pinozytose

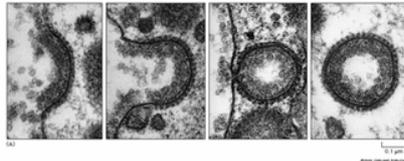
- Aufnahme von:
- Flüssigkeiten
- gelösten Stoffen



**Makropinosomen**  
( $<150\text{nm}$ )

#### Rezeptor-vermittelte Endozytose

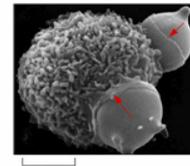
- Aufnahme kleiner Makromoleküle  
(z.B. Toxine, Hormone, Wachstumsfaktoren)



**Endosom**

#### Klassische Phagozytose

- Aufnahme 'großer' Partikel [ $>0,5\mu\text{m}$ ] durch spezialisierte Zellen  
(Mechnikov 1893)



**Phagosom**  
 $>250\text{nm}$

**Aktin abhängig**

**Abb. 1.3.1.1:** Mögliche Aufnahmemechanismen für inhalierbare Partikel (nach Aderem and Underhill 1999, Bilder: Copyright© Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings; Garland Publishing 1998).

### 1.3.2 Die Phagozytose

Evolutionär gesehen diente die Phagozytose zunächst, wie auch heute noch in Eukaryonten z.B. in Amöben, der Nahrungsaufnahme. Dieser Prozess ist auch grundlegend für die Endosymbiontentheorie, bei der sich durch die phagozytotische Aufnahme von Mikroorganismen Zellorganellen gebildet haben sollen. In höheren Organismen ist die klassische Phagozytose essentiell für das Immunsystem werden über diesen Mechanismus Pathogene aufgenommen und vernichtet (Silverstein 1995).

Dabei kann dieser Prozess durch professionelle Phagozyten (Makrophagen und Neutrophile) mit einer hohen Aufnahmeeffizienz erfolgen. Ebenso ist ein solcher Vorgang für paraprofessionelle Phagozyten, wie beispielsweise retinale Epithelzellen (Retionolaufnahme, Rabinovitch 1995) oder Endothelzellen in der Leber (Phagozytose apoptotischer Zellen, Dini et al. 2002), die allerdings eine geringere Phagozytosekapazität aufweisen, gezeigt worden.

Die Phagozytose erfolgt jedoch immer nach einem Grundprinzip:

Durch die Wechselwirkung von spezialisierten Zelloberflächenrezeptoren („pattern-recognition receptors“) mit einem spezifischen Erkennungsmotiv („pathogen-associated molekular pattern“) wird die Phagozytose initiiert, wobei zwischen körperfremd und -eigen unterschieden werden kann (Janeway 1992). Es folgt eine Aktinumstrukturierung die zur Aufnahme und zur Ausbildung des Phagosoms führt, welches dann heranreifen kann.

### **1.3.3 Molekulare Mechanismen der Phagozytose**

Je nach Erkennungsmuster wird zunächst zwischen opsoninabhängiger und -unabhängiger Phagozytose unterschieden. Des Weiteren wird die Phagozytose unter dem Aspekt des beteiligten Phagozytoserezeptors und dem damit verbundenen Erkennungsmotiv unterteilt.

Verschiedene Rezeptoren erkennen unterschiedliche spezifische Strukturen auf der Oberfläche des aufzunehmenden Partikels, woraus sich eine erste Einteilung der Rezeptoren in 2 Gruppen (opsonin-abhängig und opsonin-unabhängig) ergibt. Während bei der opsonin-unabhängigen Phagozytose Oberflächenstrukturen des aufzunehmenden Partikels (wie z.B. Lipoteichonsäure oder  $\alpha$ -Mannan der Bakterienzellwand) von spezifischen Rezeptoren erkannt werden, erfolgt bei der opsonin-abhängigen Phagozytose eine vorherige Markierung durch körpereigene Substanzen (Immunglobuline (Ig) oder Komplemente (Cx)). In Abhängigkeit von der Art, der durch die Rezeptoren erkannten Oberflächenstrukturen (z.B. Zucker, Proteine), erfolgt eine weitere Einteilung der Phagozytose durch verschiedene Rezeptortypen (Fc-Rezeptor (FcR), Komplement-Rezeptor (CR), Mannose-Rezeptor (MR), Scavenger-Rezeptor (ScR)). Die durch die verschiedenen Rezeptoren vermittelte Phagozytose, unterscheidet zum einen auf molekularer Ebene, in den an der Signaltransduktionskaskade der Phagozytose beteiligten Mediatoren. Des Weiteren treten, durch die Vermittlung der Phagozytose über verschiedene Rezeptoren, morphologische Unterschiede bei der Partikelbindung oder Partikelaufnahme auf. Auch die Rezeptor-induzierte Immunantwort (Bildung verschiedener pro- oder anti-inflammatorischer Mediatoren) variiert bei der Phagozytose über verschiedene Rezeptoren (Aderem und Underhill 1999). So erfolgt die Phagozytose IgG-opsonierter Partikel in peritonealen Monozyten durch den FcR über einen Zippering Mechanismus, bei dem sich Pseudopodien ausbilden, welche die aufzunehmenden Partikel umfließen. Im Gegensatz dazu bilden sich bei der Aufnahme Komplement opsonierter Partikel durch den CR nur sehr kleine Pseudopodien aus. Der Partikel scheint in die Zelle einzusinken, so dass die Morphologie

des Prozesses als ein „sink into the cell“ oder einfacher „Sinking Mechanismus“ bezeichnet werden kann (Silverstein 1995, Allen und Aderem 1996). Für die Phagozytose von *Legionella pneumophila* ist eine Morphologie über einen „Coiling“ Mechanismus beschrieben. Bei dieser morphologisch sehr extensiven Phagozytose wird der Parasit über die Komplementkomponente C3 an der Monozytenoberfläche gebunden, worauf das gebundene Pathogen die Bildung eines spiralförmigen Pseudopods induziert (Horwitz 1984). Neben den morphologischen Variationen treten, wie schon erwähnt, auch Unterschiede in der Immunantwort auf. Während z.B. die FcR vermittelte Phagozytose als auch die Aufnahme über den MR eine pro-inflammatorische Reaktion induzieren, führt die Aufnahme von pathogenen über den CR zu einer nicht-inflammatorischen Antwort. Die Phagozytose von apoptotischen Zellen (z.B. durch ScR) hat eine anti-inflammatorische Wirkung (Aderem und Underhill, 1999, Tabelle 1.3.3.1).

Die Phagozytose führt zum einen zur Aufnahme und Abbau von Pathogenen, apoptotischen Zellen und Zelltrümmern, zum anderen ist sie aber auch an der Induktion von Entwicklungsprozesse, Gewebeumformungen, Immunantwort und Entzündungsreaktion beteiligt, was zu einem sehr komplexen Netzwerk von Vorgängen führt. Diese Komplexität der Phagozytose wird des Weiteren durch die Mannigfaltigkeit, der möglichen beteiligten Rezeptoren und deren Vernetzung untereinander, sowie die Verschiedenheit der molekularen Signaltransduktionsprozesse, die den vielfältigen Funktionen zugrunde liegen, zusätzlich verstärkt (Abb. 1.3.3.1).

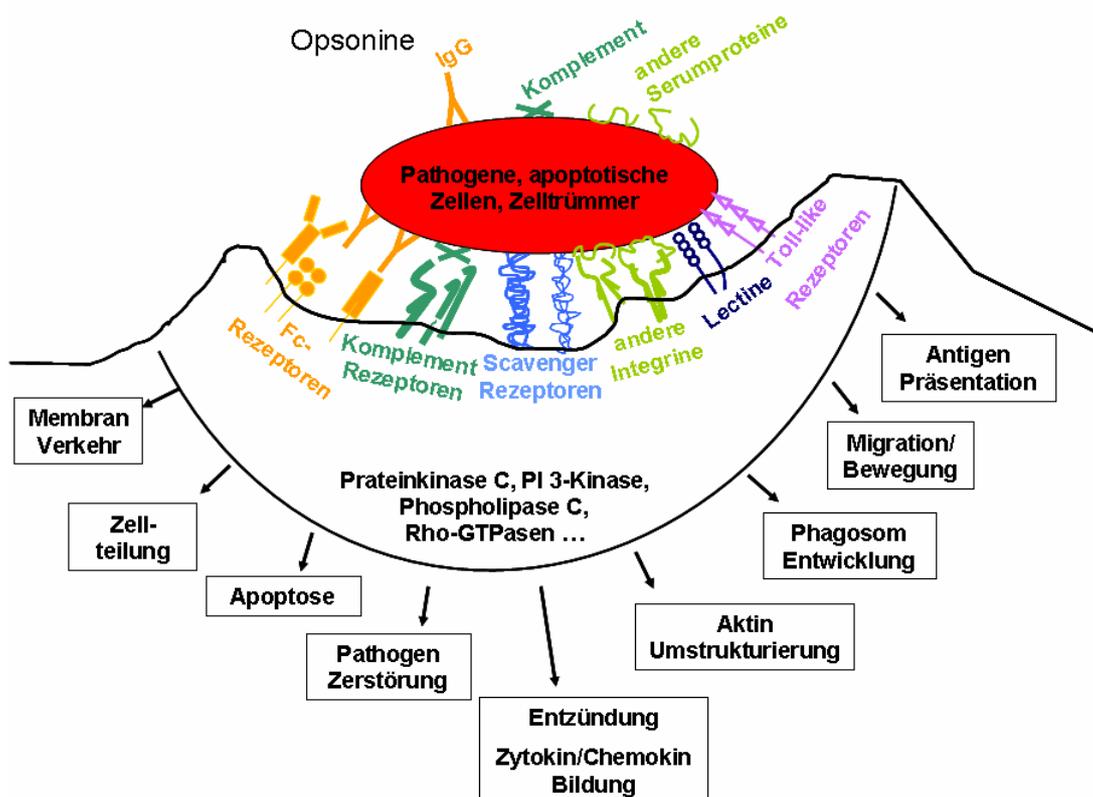


Abb. 1.3.3.1: Komplexität der Phagozytose (verändert nach Underhill und Ozinsky, 2002).

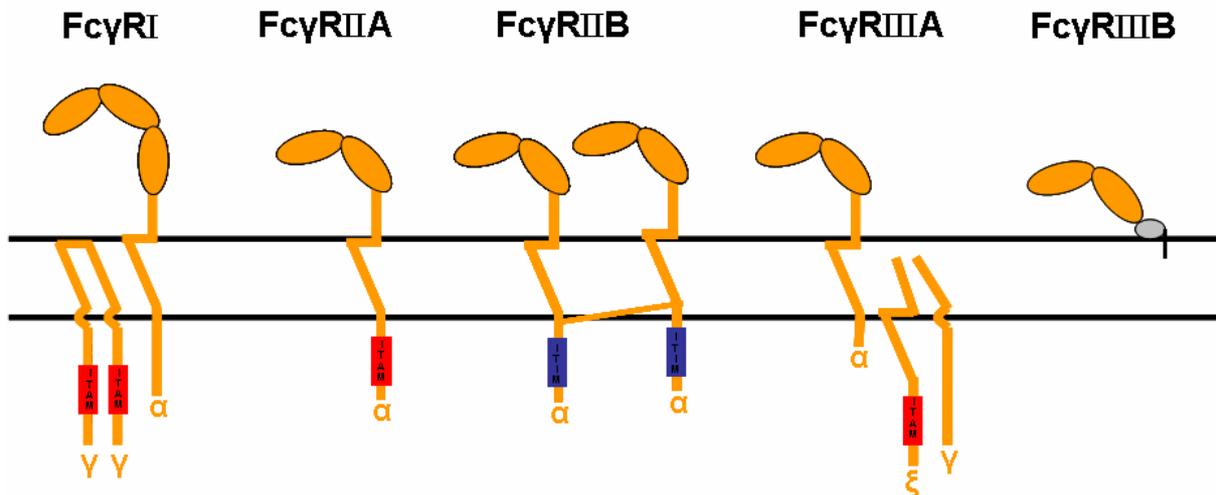
<b>Phagozytose-Rezeptor</b> (pattern recognition receptor)	<b>Erkennungsmotiv</b> (pathogen-assoziiertes molekulares Muster)	<b>Morphologie/ Signaltransduktion/ Immunantwort</b>
<b>Fc-Rezeptoren:</b> FcαRI (CD 89) FcεRII FcγRI (CD 64) FcγRII (CD 32) FcγRIII (CD 64)	IgA opsonierte Partikel IgE opsonierte Partikel IgG opsonierte Partikel IgG opsonierte Partikel IgG opsonierte Partikel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- extensive Ausbildung von Pseudopodien (Zippering Mechanismus)/</li> <li>- über die Aktivierung von ITAM, Src-K, Syk, PI3-Kinase, Rac und Cdc42 unter Membran- und Aktinzytoskelett-Umstrukturierung/</li> <li>- pro-inflammatorisch: ROS Generierung, NF-κB-Aktivierung (TNF-α, ....)</li> </ul>
<b>Komplement Rezeptoren (CR):</b> CR1 (CD35) CR3 (α <sub>M</sub> β <sub>2</sub> , CD11b/CD18, Mac1) CR4 (α <sub>X</sub> β <sub>2</sub> , CD11c/CD18, gp150/95)	C1q, C4b, C3b-opsonierte Partikel iC3b-opsonierte Partikel iC3b-opsonierte Partikel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nur geringe Ausbildung von Pseudopodien (Sinking Mechanismus)/</li> <li>- durch LPS, TNF-α, PMA.... erfolgt über PKC/Rap1 die Aktivierung des CR3, und die Phagozytoseinduktion über Rho, ROK und Arp2/3 unter Aktinzytoskelett-Umstrukturierung /</li> <li>- nicht-inflammatorisch!</li> </ul>
<b>Integrine</b> α <sub>V</sub> β <sub>3</sub> (CD 51/CD61) α <sub>5</sub> β <sub>1</sub> (CD 49e/CD29)	Fibronectin/Vitronectin opsonierte Partikel	
<b>Lectine:</b> Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR, CD206) Dectin-1 Dec-205, PLA <sub>2</sub> R, Endo180	α-Mannan (Bakterien, Pilze, Einzeller) β-Glucans (Mikroorganismen)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- über die Aktivierung von PKC, Rho, Rac und Cdc42 unter Aktinrukrutierung /</li> <li>- pro-inflammatorisch: ROS Generierung, NF-κB-Aktivierung (TNF-α, ....)</li> </ul>
<b>Scavenger-Rezeptoren (ScR):</b> ScR-AI/ScR-AII MARCO ScR-BI CD36	AcLDL, OxLDL, Poly und OligoG, Fucoidan, Gram (+)-Bakterien AcLDL, Bakterien AcLDL, OxLDL, Phospholipide AcLDL, OxLDL, Phospholipide, Kollagen, apoptotische Zellen	

Tabelle 1.3.3.1: Zusammenfassung der Phagozytose-Rezeptoren, ihrer Liganden, sowie der Mechanismen und Signaltransduktionskaskade der Phagozytose und der induzierten Immunantwort (nach Underhill und Ozinsky 2002, Tjelle et al. 2000, Greenberg und Grinstein 2002, Pearson 1996).

### 1.3.3.1 Die FcR medierte Phagozytose

Die Familie der Fc-Rezeptoren (FcR) erkennt den Fc-Teil der Immunglobuline (Ig) und gehört zur Ig Rezeptor Superfamilie. Sie wird über die Art des Ig's, welches von ihnen erkannt wird, in FcαR (IgA), FcγR (IgG) und FcεR (IgE) unterteilt. Von diesen Rezeptoren, die von vielen Zelltypen des Immunsystems expremiert werden, haben jedoch nur FcαR und FcγR die Fähigkeit zur Phagozytose (Sánchez-Mejorada und Rosales 1998, Ravetch und Bolland 2001, Garcia-Garcia und Rosales 2002). Die Klasse der FcαR wird von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen expremiert (Monteiro und Van De Winkel 2003). Die Hauptklasse der Ig-Rezeptoren bilden jedoch die FcγR, die ihrerseits wieder in verschiedene Gruppen unterteilt sind. Aufgrund von Strukturen und Möglichkeiten zur Signalweiterleitung unterscheidet man zwischen drei, wieder aus verschiedenen Isoformen bestehenden Gruppen. Alle drei Isoformen (A, B, C) des **FcγRII (CD32, 40kD)** weisen zu monomeren IgG's eine relativ geringe, jedoch gegenüber komplexen IgG's eine hohe Affinität auf. Diese aus einer einzelnen Proteinkette bestehenden Transmembranrezeptoren, besitzen neben der transmembranen-, eine extrazellulären Ligandenbindungs-, sowie eine zytoplasmatische Domäne. Die zytosolständige Proteinuntereinheit des von Phagozyten und natürlichen Killerzellen expremierten **FcγRIIA**, trägt ein ITAM-Signalmotiv (Immunglobulin-Tyrosin Activation-Motif), durch dessen Phosphorylierung das Phagozytosesignal induziert werden kann. Im Gegensatz dazu besitzt der inhibitorische **FcγRIIB**, von dem 2 Spliceformen (B1 und B2) existieren, kein ITAM-Muster. Dieser, hauptsächlich von B- und T-Lymphozyten expremierte Rezeptor, trägt nicht zur Phagozytose bei. Seine Aufgabe besteht in der negativen Regulation der Phagozytose (Aderem und Underhill 1999, Ravetch und Bolland 2001, Garcia-Garcia und Rosales 2002). Auch die beiden anderen FcγR-Klassen, **FcγRI** und **FcγRIIA**, besitzen kein aktivierendes ITAM-Muster. Expression und Signalweiterleitung dieser Rezeptoren werden über die Interaktion mit dimeren γ- und ξ-Untereinheiten (kleine ITAM tragende, transmembrane Proteine) geregelt (*Abb. 1.3.3.1.1*, Aderem und Underhill 1999, Sáutes-Fridman et al. 2003). Bei dem von Monozyten und Makrophagen expremierten **FcγRI (CD64, 70kDa)** handelt es sich um einen zu monomeren IgG's hoch affinen Rezeptor, der ebenfalls von drei verschiedenen Genen in den entsprechenden Isoformen A, B und C codiert wird (Aderem und Underhill 1999, Garcia-Garcia und Rosales 2002). Die beiden Isoformen des **FcγRIII (CD16, 50-80kD)**, **FcγRIIIA**, der von Monozyten und Makrophagen expremiert werden, und der **FcγRIIIB**, der nur in Neutrophilen vorkommt, unterscheiden sich wesentlich. Während der **FcγRIIIA** wie alle anderen FcγR eine transmembrane und ein zytoplasmatischen Domäne aufweist, besitzt der **FcγRIIIB** keines von beidem. Dieser Rezeptor ist über eine Glycophosphatidylinositolkette in der Plasmamembran verankert. Durch eine Ligandeninteraktion mit diesem Rezeptor kann eine Kalziumsignalingkaskade und Aktinpolymerisierung eingeleitet werden (Ravetch und Bolland 2001, Garcia-Garcia und

Rosales 2002). Zusammenfassend lässt sich über die Funktion der Gruppe der FcγR sagen, dass sowohl **FcγRI**, **FcγRIIA** als auch **FcγRIIIA** die Möglichkeit haben, die Phagozytose zu induzieren, wohingegen der inhibitorische **FcγRIIB** der Phagozytoseregulation dient. Die Aufgabe des **FcγRIIB** in der Phagozytose dagegen, ist noch weitgehend unbekannt (Garcia-Garcia und Rosales 2002).



**Abb. 1.3.3.1.1:** Klassen der FcγR. Die Expression und Signalweiterleitung des FcγRI, der kein eigenes aktivierendes ITAM-Muster (Immunglobulin-Tyrosin Activation-Motif) besitzt, wird über die Interaktion mit einer dimeren ITAM-Muster tragenden γ-Untereinheiten reguliert. FcγRII weist ein eigenes ITAM-Signalmotive auf, welches seine Expression und Signalweiterleitung reguliert, wohingegen der inhibitorische FcγRIIB eine ITIM-Einheit (Immunglobulin-Tyrosin-Inhibition-Motif) trägt. Auch FcγRIIIA und B weisen kein eigenes ITAM-Signalmotiv auf. Expression und Signalweiterleitung des FcγRIIIA wird über die Interaktion mit einer ITAM-Muster tragenden ξ-Untereinheiten reguliert. FcγRIIIB besitzt zudem keine transmembrane Domäne und muss über eine Glycophosphatidylinositolkette in der Plasmamembran verankert werden (verändert nach Sáutes-Fridman et al. 2003).

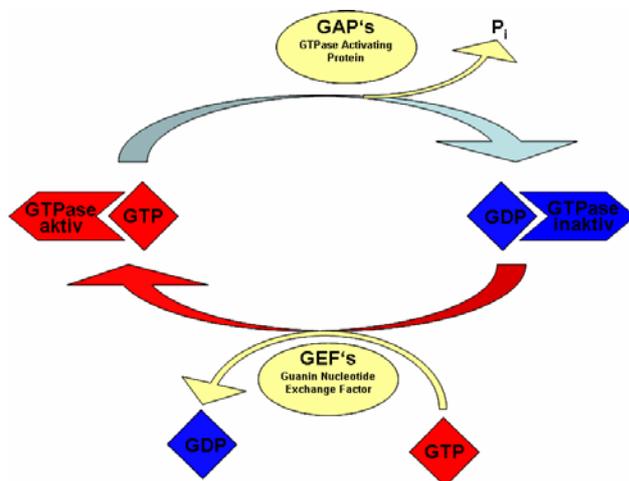
Der initiierte Schritt der FcγR induzierten Phagozytose und der damit verbundenen Signaltransduktionskaskade ist die extrazelluläre Wechselwirkung zwischen dem IgG opsonierten Liganden und dem Rezeptor. Dabei kommt es zur Rezeptor-Clusterung und Phosphorylierung der ITAM-Domäne. Rezeptor Ligand und ITAM-Phosphorylierung scheinen dabei von Rezeptor assoziierten Src-Kinasen, wie Hck, Fgr, Fyn und Lyn unterstützt zu sein (Greenberg 1995, Fitzer-Attas et al. 2000, Suzuki et al. 2000, Cox et al. 2001). Bei der Src-Kinase Familie handelt es sich um eine Gruppe von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen gleicher Struktur. Sie sind N-terminal über eine meritylierte oder palmylierte Ankergruppe mit der Plasmamembran verknüpft. C-terminal besitzen sie eine SH2-Domäne (Src-homologe Gruppe 2), gefolgt von einer kurzen, Tyrosin tragenden Region. Im inaktiven Zustand ist dieses Tyrosin phosphoryliert und bildet mit der SH2-Domäne eine intramolekulare Schleife. Bei der Aktivierung wird das Tyrosin dephosphoryliert, wodurch über eine Konformationsänderung die katalytische Domäne der Src-Kinase freigegeben wird. Es wird angenommen, dass Src-Kinasen, die durch die Ligandenbindung initiierte Phagozytose

antreiben, indem sie durch die Abgabe des inaktivierenden Phosphats an das ITAM zur Phosphorylierung und Aktivierung des FcγR beitragen. Die Src-Kinasen selbst werden durch diese Dephosphorylierung aktiviert und können über die SH2-Domäne an den Rezeptor ankoppeln (Bolen 1991, Hunter et al. 1993, Strzelecka et al. 1997, Cooper und Howell 2003, Signal Transduction S. 294/295, 2003). Die Phosphorylierung des ITAM bewirkt wiederum die Rekrutierung weiterer Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, der Syk/ZAP70-Kinasen. Die zytosolständige Kinase Syk besitzt zwei SH2-Domänen, über die sie mit dem ITAM-Muster des FcγR in Wechselwirkung treten kann. Die Aktivierung dieser Kinase, über die Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste, wird als für die FcγR essentiell beschrieben (Cox et al. 2001). Sie scheint den aktivierten Rezeptor räumlich mit weiteren zytosolischen Mediatoren der Phagozytose zu koppeln.

Der entscheidende Schritt in der FcγR-Phagozytose ist die Ausbildung von Pseudopodien, welche die zu phagozytierenden Partikel umschließen, wodurch es zur Aufnahme unter Ausbildung des Phagosoms kommt. Dieser Vorgang bedarf sowohl einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts als auch der Plasmamembran. Als für die Umstrukturierung der Plasmamembran verantwortlicher Mediator wird die PI3-Kinase (PI3-K, Phosphatidylinositol (PI)3-Kinase) diskutiert. Eine Inhibition dieser Kinase führt zur Unterdrückung der Phagozytose, wobei aber weder Partikelbindung noch Aktinumstrukturierung beeinflusst werden (Araki et al. 1996, Cox et al. 1999, Aderem 2003). Die PI3-K besteht aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110β) Untereinheit. Im Prozess der Membranamstrukturierung wird die PI3-K aktiviert, indem über die aktivierte Syk-Kinase die regulatorische p85-Untereinheit phosphoryliert wird. Durch diesen Schritt wird die katalytische p110β Untereinheit aktiviert und kann so in der Rezeptor umgebenden Membran die Umformung von PI-4,5-bisphosphat [PI(4,5)P<sub>2</sub>] zu PI-3,4,5-triphosphat [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>] katalysieren. Dieses Phospholipid ist entscheidend für die Rekrutierung unterschiedlicher Signalproteine (z.B. Akt/PKB) und erhöht des Weiteren die Aktivität der GEF's (Guanin Exchange Factors, z.B. Tiam, Vav1 und ARF), welche die Aktivität der kleinen GTPasen regulieren (Underhill und Ozinisky 2002, Swanson und Hoppe 2004). Die PI3-K ist als ein Schlüsselprotein an der Signaltransduktion vieler Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Proteine beteiligt, die Wachstum und Bewegung der Zelle beeinflussen. Durch die PI3-K vom Typ III wird zudem die Phosphorylierung des PI zu PI-3-Phosphat [PI(3)P] katalysiert. Dieses Phospholipid unterstützt die Entwicklung des Phagosoms und könnte auch an der Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit am oxidativen Burst beteiligt sein (Vieira et al. 2001, Gillooly et al. 2001, Kanai et al. 2001). Im phagozytotischen Prozess von IgG-opsonierten Partikeln scheint die PI3-K jedoch hauptsächlich für die Membranamstrukturierung verantwortlich zu sein, so wird durch die Inhibition der Kinase die

Membranausbreitung um den, sowie der Membranschluß hinter dem aufzunehmenden Partikel unterbunden (Cox et al.1999).

An der Aktinrekrutierung bei der FcγR vermittelten Phagozytose sind die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac maßgeblich beteiligt. Dabei erfolgt die Aktivierung der GTPasen entweder über eine direkte oder über eine indirekte Aktivierung der GEF's durch die Kinase Syk (Cox und Greenberg 2001). Die in den Prozess der Phagozytose involvierten RhoGTP-bindenden Proteine (GTP bindende Proteine der Ras Familie) regulieren in der eukaryotischen Zelle viele essentielle Signalwege und kontrollieren wichtige Zellfunktionen. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie, zu der unter anderem Ras, Rho, Rac, Cdc42, Rab und Arb gehören, sind in Prozessen wie Proliferation und Differenzierung, Migration, Ausbildung der Zellform und Wachstum involviert. Sie sind aber auch über die Phagozytose und die Regulierung der NADPH-Oxidase Aktivität an der Abwehr von Pathogenen beteiligt. Die GTPasen können zellular als inaktive GDP-gebundene Form vorliegen, die in einem Kreislauf durch den GDP/GTP-Austausch in die aktive GTP-gebundene Form übergeht. Reguliert wird dieser Zirkel durch GEF's (Guaninnucleotid Exchange Factors) und GAP's (GTPase activating proteins). GEF's, welche die GDP-Dissoziation und die GTP-Bindung induzieren, unterstützen die Bildung der aktiven Form. GAP's dagegen haben, indem sie die intrinsische GTPase Aktivität stimulieren, den gegenteiligen deaktivierenden Effekt (siehe *Abb. 1.3.3.1.2*, Chimini und Chavrier 2000, Bar-Sagi und Hall 2000, Signal Transduction S. 71-101, 2003).

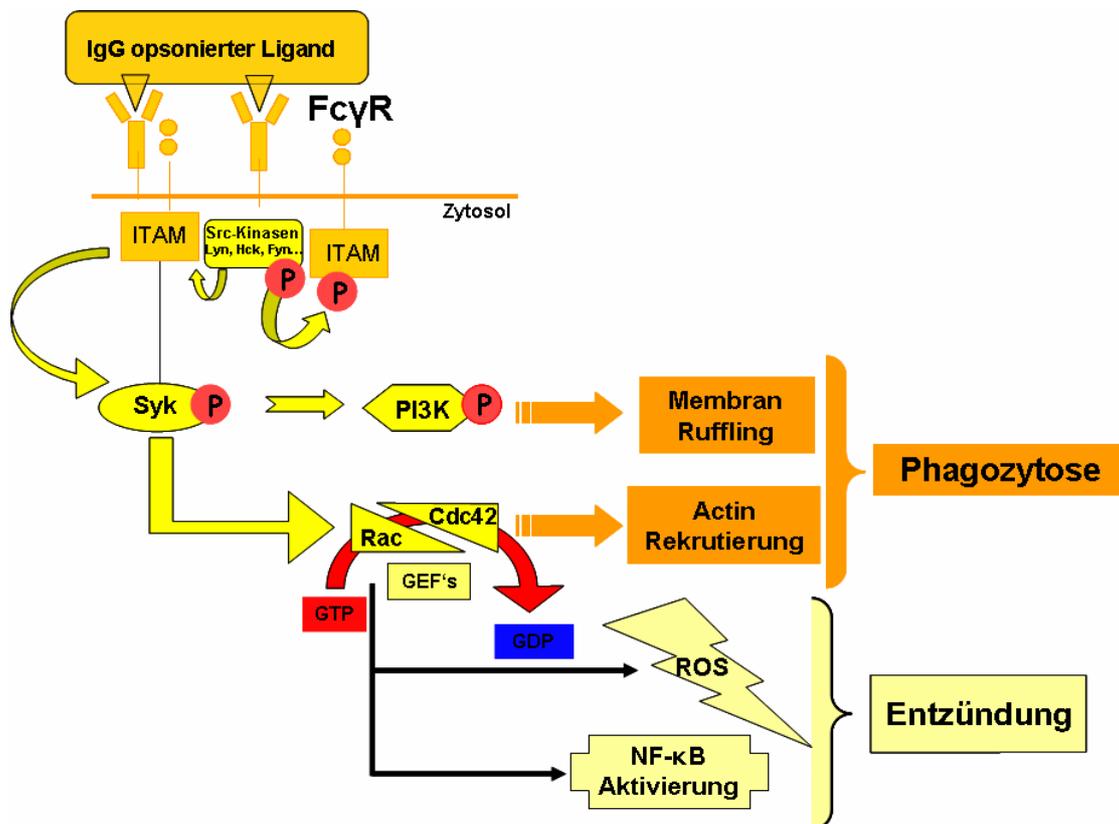


**Abb.1.3.3.1.2:** Schematische Darstellung des GTPasen Zyklus. Die inaktive GDP-gebundene Form geht unterstützt von GEF's (Guanin Nucleotide Exchange Factors) durch den GDP/GTP-Austausch in die aktive GTP gebundene Form über. Durch GAP's (GTPase activating proteins) welche die intrinsische GTPase Aktivität stimulieren, erfolgt die Rückführung in die GDP gebundene Form (nach Bar-Sagi und Hall 2000).

Über GTPasen, in der durch die Kinase Syk aktivierten GTP-gebundenen Form, kann dann die für die Phagozytose nötige Umstrukturierung der Aktin-Filamente kontrolliert werden. Bei der FcγR vermittelten Phagozytose, die auch als Typ1 Phagozytose beschrieben wird, erfolgt dies unter der Einwirkung der GTPasen Cdc42 und Rac. In einer zeitaufgelösten mikroskopischen Studie konnte die Rekrutierung der aktivierten GTPasen Cdc42, Rac1 und Rac2 in distinkten Mustern gezeigt werden. Während sich Cdc42•GTP an der Kante der sich ausbildenden Pseudopodien konzentriert, zeigen sich Anreicherungen von Rac1•GTP in den aktin-reichen Regionen der phagozytotischen Ausstülpung. Zudem erscheinen

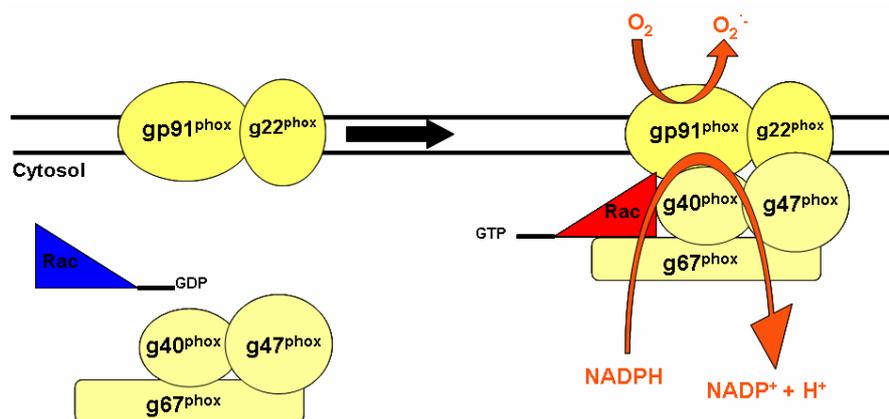
Konzentrationserhöhungen von Rac1•GTP und Rac2•GTP in aktin-armen Region der Ausstülpung (Hoppe et al. 2004). Die Aktivierung von Rac wird dabei über Vav, einem GEF dessen Aktivität vermutlich über Phosphatinositollipide kontrolliert wird, reguliert (Patel et al. 2002). Die Kopplung des Phagozytosesignals an die Aktin-Filamente erfolgt dann über weitere Effektoren, wie WASP oder Arp2/3, sowie durch Zytoskelettproteine, wie Cofilin, Vinculin und Paxilin, welche die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts vermitteln (Aderem und Underhill 1999, Greenberg 2001). Aus der Kombination von Membranstukturierung und Zytoskelettrecrutierung wird so die Ausbildung des Phagosoms eingeleitet. Vereinfacht lässt sich die FcγR medierte Phagozytose wie folgt zusammenfassen:

Durch die Liganden/Rezeptor-Wechselwirkung wird die Phagozytose initiiert, indem Src-Kinase unterstützt die Phosphorylierung des FcγR-ITAM-Musters und die Clusterung von Rezeptoren katalysiert wird. Im nächsten Schritt wird die Kinase Syk durch eine Interaktion mit der ITAM-Domäne phosphoryliert, welche die Aktivierung sowohl der PI3-K als auch der GTPasen Rac und Cdc42 reguliert. Durch die aktivierte PI3-K wird die für den phagozytotischen Prozess nötige Membranstukturierung induziert. Durch Aktivierung der GTPasen Rac und Cdc42 erfolgt über weitere Effektoren, die Rekrutierung der Aktin-Filamente. Durch die Membran- und Aktinumstrukturierung kommt es dann zur Formation des Phagosoms (siehe Abb. 1.3.3.1.3).



**Abb. 1.3.3.1.3:** Vereinfachte schematische Darstellung der Signaltransduktionskette während der FcγR-medierte Phagozytose (vereinfacht nach Kwiatkowska und Sobota 1999).

Die Rezeptoraktivierung in der FcγR vermittelten Phagozytose bewirkt gleichzeitig die Induktion einer pro-inflammatorischen Signalkette, sowie die Bildung von antimikrobiellen Substanzen. Dadurch wird zum einen die Vernichtung des phagozytierten Pathogens ermöglicht und zum anderen das Immunsystem angeregt und auf eine mögliche Invasion von weiteren Pathogenen vorbereitet. Eine induzierte Reaktion ist die Bildung von ROS, welche einerseits die phagosomale Lyse des Pathogens bewirkt andererseits aber auch, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, zur Aktivierung des NF-κB-Weges führen kann. Dadurch erfolgt z.B. die Synthese von TNF-α, welches eine pro-inflammatorische Immunantwort hervorruft. Die Bildung von ROS, durch die Reaktion von Sauerstoff mit dem zellularen NADPH ( $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^{\cdot -} + NADP^+ + H^+$ ), kann entweder durch einen mit der mitochondrialen oder der plasmatischen Membran verankerten NADPH-Enzym-Komplex katalysiert werden (Barbior 1999, Dyke et al. 2003). Der NADPH-Oxidase-Komplex besteht aus verschiedenen Proteinkomponenten, zu denen unter anderem auch die GTPase Rac gehört. Im nicht aktivierten Zustand sind die Bestandteile dieses Komplexes teilweise membrangebunden (ein Heterodimer aus gp91<sup>phox</sup> (Nox Oxidase) und g22<sup>phox</sup>) oder liegen gelöst im Zytosol (Rac•GDP, g47<sup>phox</sup>, g40<sup>phox</sup>, g67<sup>phox</sup>) vor. Während der FcγR medierten Phagozytose kommt es zu einer Zusammenlagerung dieses Komplexes unter der Phosphorylierung der gp40<sup>phox</sup>. Die Aktivierung des Komplexes durch diesen Phosphorylierungsschritt kann durch zahlreiche Kinasen, wie z.B. der PI3-K oder der Protein-Kinase-C (PKC) katalysiert werden. Gleichzeitig wird auch Rac durch den GEF induzierten GDP/GTP-Austausch aktiviert und zum Komplex transloziert. An dem so gebildeten Komplex erfolgt dann die Superoxidbildung durch die Reduktion des extrazellulären Sauerstoffs, bei der NADPH als Elektronen-Donor dient (Abb. 1.3.3.1.4, Barbior 1999, Foreman und Torres 2002, Park 2003, Sumimoto et al. 2004).



**Abb. 1.3.3.1.4:** Schematische Darstellung der Aktivierung der NADPH-Oxidase bei der FcγR-medierten Phagozytose (vereinfacht nach Sumimoto et al. 2004).

Die Formation von ROS ist eine wichtige Makrophagenfunktion. ROS dient dabei zum einen als sekundärer Vermittler (second messenger), der z.B. an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist (siehe Kapitel 1.1.3). Zum anderen haben Superoxid (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) eine antimikrobielle Funktion. Der respiratorische Burst, wie dieser Prozess der Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) Produktion auch genannt wird, ermöglicht zudem die extrazelluläre als auch intrazelluläre (im Phagolysosom) Abtötung und Lyse von Mikroben (Iles und Forman 2002).

### *1.3.3.2 Die CR (Komplementrezeptor) medierte Phagozytose*

Durch die Komplement-Rezeptoren (CR) werden Partikel, die von Komponenten des Serums opsoniert wurden, erkannt und aufgenommen. Die CR werden in drei Klassen unterteilt. Der von Erythrozyten, Phagozyten und Lymphozyten exprimierte **CR1 (CD35)** besteht aus einer transmembranen Proteinkette mit einer großen extrazellulären Erkennungsdomäne und einem kurzen intrazellulären Ende. CR1 kann zwar C1q, C4b und C3b opsonierte Partikel erkennen und binden, ist jedoch allein nicht in der Lage, ihre Phagozytose einzuleiten. Im Gegensatz zum Monomeren CR1 sind die, zur Integrin Familie gehörenden Rezeptoren, **CR3 (CD11b/CD18, Mac1)** und **CR4 (CD11c/CD18, gp150/95)** Heterodimere bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten verschiedener Formationen ( $\alpha_M\beta_2$ , CR3;  $\alpha_X\beta_2$ , CR4; siehe *Abb. 1.3.3.2.1*, Klickstein et al. 1997, Ghiran et al. 2000, Dip und Anderson 2000). CR4 und CR3 erkennen und phagozytieren mit inaktiven Komplement Komponenten (iC3b) opsonierte Partikel und werden von Neutrophilen und Monozyten expremiert. Die Expression beider Klassen ist jedoch nur sehr gering, wird aber bei der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen verstärkt (Takizawa et al. 1996, Ofek et al. 1995). Im Gegensatz zur Aufnahme des IgG-opsonierten Liganden, durch den konstitutiv aktivierten FcR, bedarf die Phagozytose von Komplement-opsonierten Liganden einer zusätzlichen Aktivierung, z.B. über die Stimulation mit PMA (Phorbol-12-Myristol-13-acetat) oder TNF- $\alpha$ . PMA und TNF- $\alpha$  induzieren dabei die Aktivierung der PKC, welche dann die Phagozytose initiiert (Aderem und Underhill 1999). Dabei ist die Aktivität der PKC essentiell für die Phagozytose, nicht aber für die Bindung von iC3b-opsonierten Partikeln (May and Machesky 2000). Ebenfalls im Kontrast zur FcR-Phagozytose steht die Morphologie der Aufnahme über den CR, die elektronenmikroskopisch und immunohistochemisch untersucht wurde. Beide Prozesse bedürfen zwar einer umfassenden Aktinrekrutierung, doch erweist sich die CR-Phagozytose als eine eher passive Aufnahme. Es werden nur kleine Pseudopodien ausgebildet und der Partikel scheint eher in die Zelle einzusinken als von ihr umschlossen zu werden. Des Weiteren existieren nur wenige lose Kontaktpunkte zwischen der Membran und dem Komplement opsonierten Liganden, in denen eine Konzentrierung von F-Aktin sowie der Zytoskelettproteine Paxilin, Vinculin und  $\alpha$ -Actinin zu finden ist (Allen und Aderem 1996). Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass die CR vermittelte Phagozytose unabhängig von Syk oder den GTPasen Rac und Cdc42 abläuft, jedoch Arp2/3, RhoA und PKC beteiligt sind (Caron und Hall 1998, May et al. 2000). Die Beteiligung der GTPasen an der Signaltransduktionskaskade der CR-induzierten Phagozytose wurde von Niedergang und

Chavier (2005) zusammengefasst. Demnach wird die Aktivierung des CR über die GTPase Rap1 (inside-out signaling) kontrolliert. Nach der Aktivierung des CR erfolgt eine Signalweiterleitung zur GTPase RhoA, die über ROK (Rho-Kinase) und Arp2/3 die Rekrutierung des Aktinzytoskeletts reguliert. Zusammenfassend lässt sich ein möglicher Mechanismus der CR3 vermittelte Phagozytose von iC3b-opsonierten Partikeln wie folgt beschreiben:

Zunächst erfolgt die Aktivierung des Rezeptors durch z.B. pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , über PKC. Dabei wird vermutlich der CR3 über eine Serinphosphorylierung der  $\beta_2$ -Untereinheit aktiviert, was zu einer CR-Konformationsänderung führt, die die Clusterung des Rezeptors bewirkt, wodurch die Bindung des aufzunehmenden Partikels ermöglicht wird. Damit ist die Signaltransduktionskaskade der Phagozytose induziert (May and Machesky 2000). Es konnte jedoch auch eine Aktivierung des CR3 über die GTPase Rap1 nach Stimulation mit LPS oder PMA gezeigt werden, welche die Phagozytose eingeleitet (Caron et al. 2000). Die Aufnahme des gebundenen Partikels erfolgt dann durch die Aktivierung der GTPase RhoA, was als TypII Phagozytose bezeichnet wird. Dadurch wird sowohl die Serin/Threonin-Kinase ROCK als auch Arp2/3 aktiviert, welche dann über Zytoskelettproteine wie Vinculin oder Paxilin, welche zur Internalisierung führende Aktinstrukturierung bewirken (Abb. 1.3.3.2.1, Greenberg 2001)

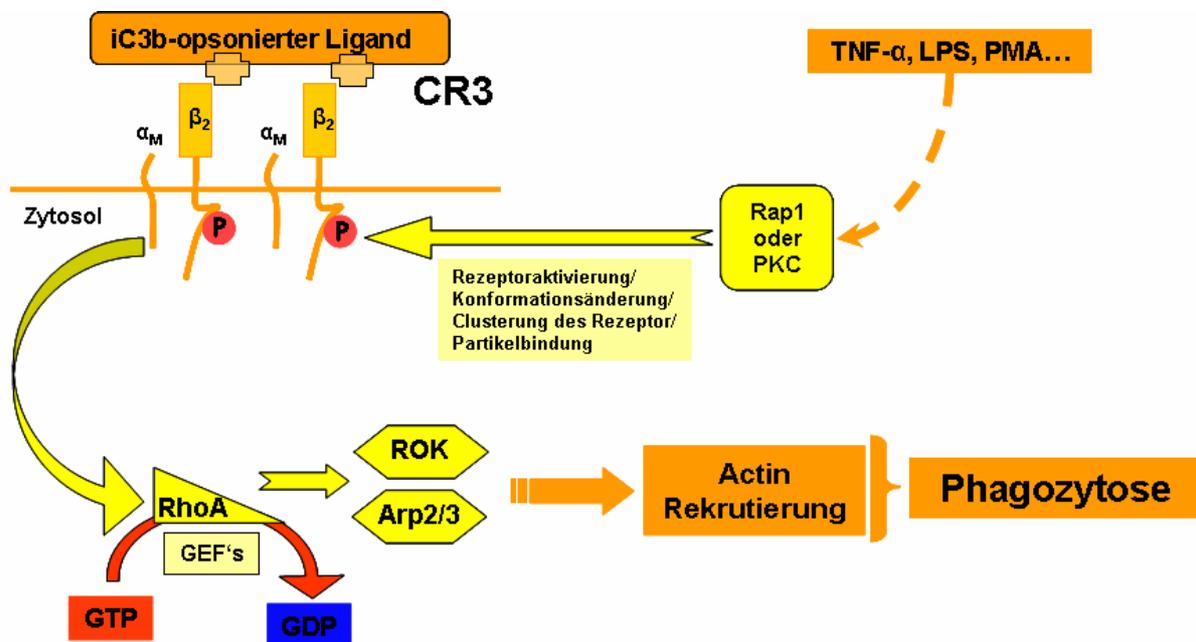


Abb. 1.3.3.2.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Signaltransduktionskette während der CR3 vermittelten Phagozytose (vereinfacht und verändert nach Greenberg 2001).

Im Gegensatz zu der Fc $\gamma$ R-vermittelten Aufnahme resultiert aus der Phagozytose über den CR keine bzw. nur eine geringfügige pro-inflammatorische Antwort (Aderem und Underhill 1999).

### 1.3.3.3 Andere an der Phagozytose beteiligte Integrine

Zur Familie der Integrine gehören unter anderem der CR3 und CR4, aber auch andere heterodimere Integrine wie  $\alpha_5\beta_1$  oder  $\alpha_v\beta_3$  (siehe Abb. 1.3.3.3.1). Diese, als Adhäsionsmoleküle bekannten und von Makrophagen, Mikroglia, dendritischen Zellen sowie retinalen Epithelzellen exprimierten Rezeptoren vermitteln vor allem die Phagozytose apoptotischer Zellen. So konnte gezeigt werden, dass der Vitronektin-Rezeptor (VnR)  $\alpha_v\beta_3$  an der Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen und Lymphozyten beteiligt ist (Savill et al. 1990). Dabei wird eine Wechselwirkung des VnR mit dem CD36 (Scavenger-Rezeptor der Klasse B) diskutiert, welche die Bindung der apoptotischen Zelle über das molekulare Brückenprotein Thombospondin vermittelt (Ren et al. 1995).

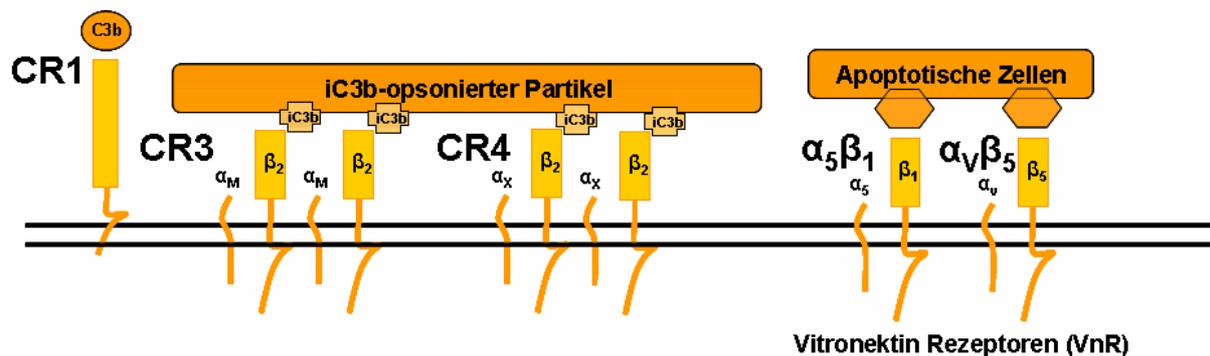
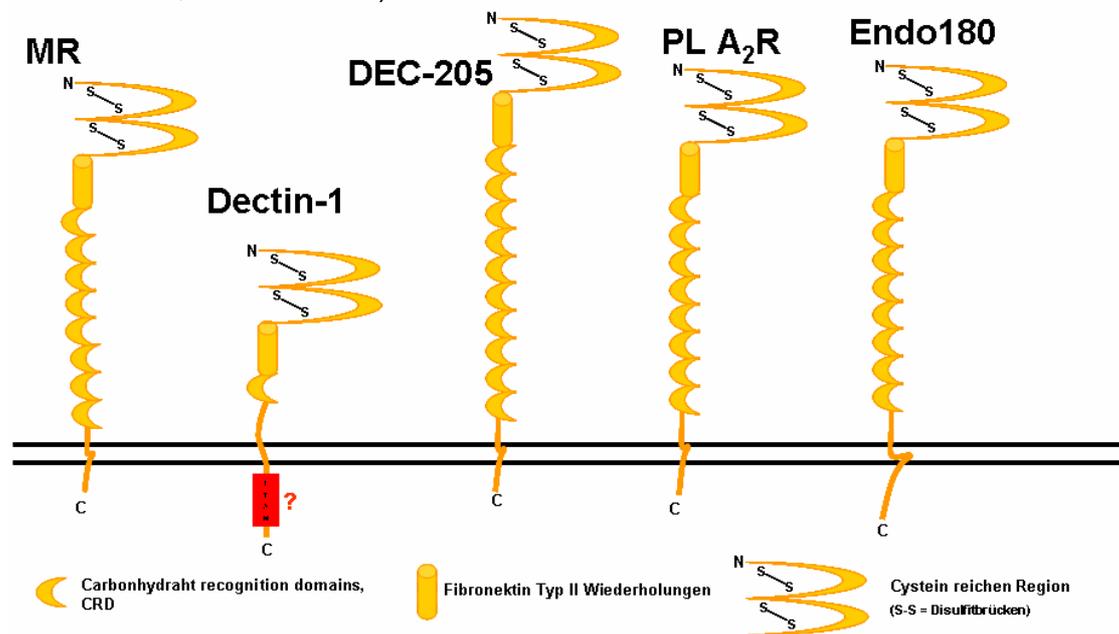


Abb. 1.3.3.3.1: Schematische Darstellung von Komplement- (CR) und Vitronektin- (VnR) Rezeptoren (verändert nach Molecular Mechanisms of Phagocytosis, Rosales 2005).

### 1.3.3.4 Die Mannose-Rezeptor medierte Phagozytose

Mannose-Rezeptoren (MR) gehören zur C-Typ Lectin Unterfamilie und sind in der Lage körpereigene und körperfremde (z.B. Oberflächenkohlenhydrate von Mikroorganismen) Kohlenhydrate zu erkennen. Sie vermitteln z.B. die Erkennung und Aufnahme von Zytoplastenpartikel aus der Zellwand von Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), die aus  $\alpha$ -Mannan, Mannoproteinen und  $\beta$ -Glucan bestehen. Die Bindung und Aufnahme sind z.B. durch  $\alpha$ -Mannan, Mannoside oder  $\beta$ -Glucan kompetitiv zu inhibieren (Sung et al. 1983, Noorman et al. 1997, Janusz et al. 1986). Zu der Familie der C-Typ Lectine gehört unter anderem der **Makrophagen Mannose-Rezeptor (MR, CD206)**, der von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Er erkennt und bindet Mannoseoligosaccharide (wie  $\alpha$ -Mannan), welche auf der Oberfläche zahlreicher Bakterien, Pilze und Einzeller zu finden sind und vermittelt die Phagozytose dieser. Der transmembrane Rezeptor besitzt eine extrazelluläre N-terminale Domäne mit 8 C-Typ Lectin-Kohlenhydrat-Erkennungseinheiten (Carbonhydrat recognition domains, CRD), gefolgt von Fibronektin Typ II Wiederholungen, die mit einer Cystein-reichen Region beendet wird. Intrazellular folgt der transmembranen Domäne eine kurze C-terminale zytosolische Domäne (Stahl et al. 1998, Innate Immunity 2006). **Dectin-1**, ein weiteres Mitglied der Lectinfamilie, erkennt  $\beta$ -Glucan, und wird daher

auch als  $\beta$ -Glucan-Rezeptor bezeichnet.  $\beta$ -Glucanpolysaccharide sind in der mikrobiellen Zellwand vorzufinden, deren Erkennung und Phagozytose von diesem Rezeptor vermittelt wird. Dectin-1 wird von Makrophagen expremiert und besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne mit einer CRD-Einheit, einer transmembranen Untereinheit und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz mit einer möglichen ITAM-Domäne. Beide Makrophagenrezeptoren, MR und Dectin-1, koordinieren die Aufnahme von Zymosan durch Makrophagen (Underhill und Ozinsky 2002, Innate Immunity 2006). Des Weiteren gehören der Phospholipase A2 Rezeptor (PLA<sub>2</sub>R), DEC-205 und Endo180 zur Familie der C-Typ Lectine. Diese Rezeptoren scheinen aber keine phagozytotische Funktion zu besitzen (East und Isacke 2002, *Abb. 1.3.3.4.1*).



**Abb. 1.3.3.4.1:** Schematische Darstellung der Mannose Rezeptoren der C-Typ Lectin Unterfamilie (verändert nach Stahl und Ezekowitz 1998, Underhill und Ozinsky 2002).

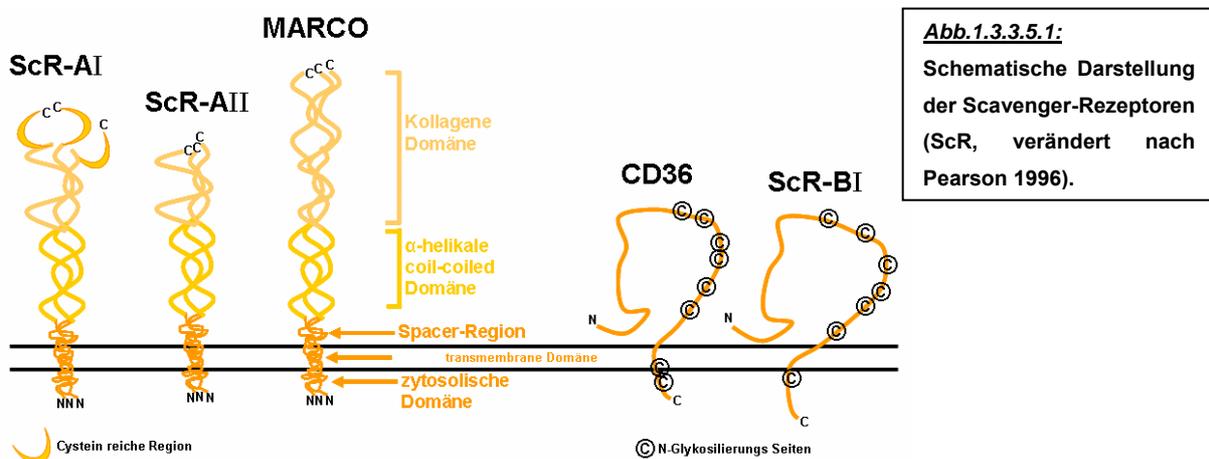
Über den molekularen Mechanismus der MR vermittelten Phagozytose ist noch wenig bekannt, doch konnte für die Aufnahme von Zymosan Partikeln gezeigt werden, dass Proteine wie z.B. F-Aktin und PKC zum sich ausbildenden Phagosom rekrutiert werden (Allen und Aderem 1996). Des Weiteren sind, in humanen AM, sowohl die GTPasen Cdc42, Rac1 als auch Rho an der MR vermittelten Phagozytose von *Pneumocystis Pneumonia* beteiligt (Zhang et al. 2005).

Wie durch die FcR vermittelte Phagozytose wird auch durch die Interaktion von Liganden mit dem MR ein pro-inflammatorisches Signal eingeleitet, welches in der Bildung von ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen resultiert. So konnte durch die Inkubation mit dem MR-Liganden Mannan in humanen Monozyten die Bildung von ROS und TNF sowie in humanen Makrophagen die Bildung dieses pro-inflammatorischen Proteins induziert werden (Mytar et al. 2004). Ebenso konnte eine MR-vermittelte Aktivierung des NF- $\kappa$ B durch *Pneumocystis pneumonia* gezeigt werden (Zhang et al. 2004).

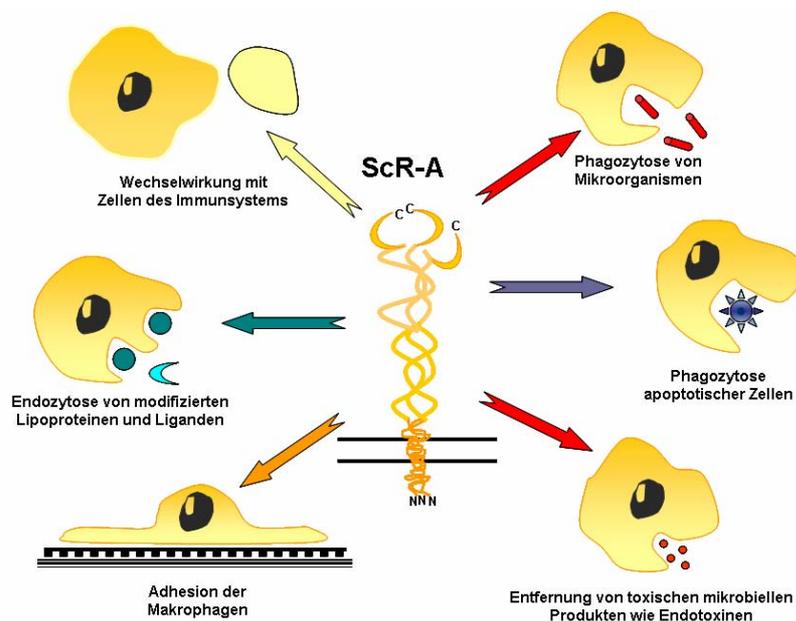
Die phagozytotischen Signale des FcR und des MR sind also pro-inflammatorisch, wohingegen das CR-Phagozytosesignal keine Entzündungsantwort induziert.

### 1.3.3.5 Die Scavenger-Rezeptor-vermittelte Phagozytose

Auch die Familie der strukturell sehr unterschiedlichen Scavenger-Rezeptoren (ScR), die viele verschiedene Liganden (modifizierte Lipoproteine, Polyribonukleotide, Lipopolysaccharide, siehe *Tabelle 1.3.3.1*) spezifisch erkennen, nimmt an der Phagozytose von Mikroorganismen teil. Allerdings scheinen für deren Bindung und der daraus folgenden Aufnahme Corezeptoren nötig zu sein (Pearson 1996, Underhill und Ozinsky 2002). Die transmembranen Rezeptoren dieser Familie werden in 2 Gruppen, ScR-A und ScR-B eingeteilt, die wieder verschiedene Typen beinhalten. Zur Unterfamilie **ScR-A** gehören die hauptsächlich von Monozyten und peritonealen sowie Gewebemakrophagen expremierten Rezeptoren **ScR-AI**, **ScR-AII**, sowie der von peritonealen Makrophagen und Makrophagen in der Milz und in den Lymphknoten expremierte **MARCO** (Makrophagen Rezeptor mit K(C)ollagener Struktur). Diese homotrimeren, transmembranen Glykoproteine besitzen extrazellulär eine  $\alpha$ -helikale coil-coiled Region, gefolgt von einer kollagenen Struktur, die der Ligandenbindung dient. Intrazellulär folgt der transmembranen Domäne eine relativ kurze zytoplasmatische Region. ScR-AI und MARCO weisen zudem eine C-terminale extrazelluläre Cystein-reiche Region (SRCR, Scavenger-Rezeptor Cystein reiche Domäne) auf. Zur zweiten Klasse der **ScR-B** gehören **ScR-BII** und **CD36**, die von Zellen in Geweben expremiert werden, die am Lipidmetabolismus oder an der Immunabwehr beteiligt sind. Dazu gehören neben Monozyten und Makrophagen auch B-Lymphozyten, kapillare Endothelzellen und Adipozyten. Die monomeren Rezeptoren besitzen eine sehr kurze zytoplasmatische C-terminale Domäne (CD36>10AS, ScR-BII 45 AS), die reich an Prolin, Glycin und Cystein ist. Der transmembranen Region folgt eine große extrazelluläre Domäne, die N-terminal viele N-Glykosylierungsseiten aufweist (*Abb. 1.3.3.5.1*, Pearson 1996).



ScR regulieren über ihre LDL (Low Density Lipoproteine)-bindenden Eigenschaften den Lipidmetabolismus. Neben der Bindungsaffinität zu OxLDL (oxidiert) und AcLDL (acetyliert, Krieger 2001) sind sie aber auch an der Bindung und Phagozytose von apoptotischen Zellen (Platt et al. 1996, Brown et al. 2000), Bakterien oder unopsonierten Partikeln (Dunne et al. 1994, Thomas et al. 2000, Arredouani et al. 2005) beteiligt. Dabei können sie verschiedene biologische Funktionen beeinflussen. In Makrophagen spielt z.B. der ScR-A, durch Wechselwirkung mit Zellen des Immunsystems und der Aufnahme von Mikroorganismen, eine Rolle in der Immunreaktion. Des Weiteren erfolgen durch diesen Rezeptor die Phagozytose apoptotischer Zellen und die Endozytose modifizierter Lipoproteine. ScR-A beeinflusst die Eliminierung toxischer, mikrobieller Produkte ebenso, wie die Adhäsion von Makrophagen (Platt und Gordon 2001, *Abb. 1.3.3.5.2*).



**Abb. 1.3.3.5.2:** Schematische Darstellung der Funktionen des Scavenger-Rezeptors ScR-A (verändert nach Platt und Gordon 2001).

Über die Bindungseigenschaften des ScR wurden viele Untersuchungen durchgeführt, doch ist noch nicht geklärt, ob er allein in der Lage ist die Phagozytose einzuleiten und selbständig die nötige Aktivierung des Aktinzytoskelett zu bewirken (Ernst 1998, Underhill und Ozinsky 2002). Die Ligandenbindung bewirkt jedoch die Induktion der Freisetzung von ROS und TNF, sowohl durch den ScR-A (Liganden: Fucoidan, Polyguanoside (polyG), modifiziertes LDL) als auch den ScR-B (Liganden: Phosphatidylserin, natives und modifiziertes LDL) in Monozyten (Mytar et al. 2004).

1.3.3.6 Pro- und anti-inflammatorische Antwort auf die Phagozytose

Wie und welche Zytokine und Chemokine als Folge der Ligandenbindung und/oder der Phagozytose gebildet und freigesetzt werden, ist vom Phagozytose-Rezeptor, den Liganden und dem phagozytierenden Zelltyp abhängig. Bei der Aktivierung der Gentranskription können z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) mitwirken. Dieser Rezeptortyp kann sowohl bei der Erkennung und Phagozytose als auch bei der Induktion der Immunantwort eine Rolle spielen. Ein Beispiel für die Beteiligung von TLR an der pro-inflammatorischen Immunantwort ist die Phagozytose von Zymosan durch Makrophagen über den MR oder Dectin-1. Die Aufnahme selbst wird dabei allein durch das Lektin kontrolliert und ist vom TLR unabhängig. Die Zymosanphagozytose induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung und die daraus folgende Bildung des pro-inflammatorischen Zytokines TNF- $\alpha$  dagegen, ist von der Wechselwirkung von TLR2 und TLR6 abhängig. Im Gegensatz dazu kann die pro-inflammatorische Immunantwort, infolge der FcR vermittelte Phagozytose, sowohl vom Rezeptor selbst, z.B. über eine Signalkaskade über die ITAM-Domäne oder über TLR induziert werden. Besonders bei Multiligandenrezeptoren, wie den ScR, wird die Bedeutung des Liganden auf die resultierende Immunantwort deutlich. Während die Bindung und Phagozytose von Mikroorganismen durch ScR in einem pro-inflammatorischen Signal endet, resultiert die Interaktion dieser Rezeptoren mit apoptotischen Zellen in einer anti-inflammatorische Antwort (Underhill und Ozinsky 2002, Stuart und Ekzekowitz 2005).

Der Prozess der Phagozytose endet mit der Bildung des Phagosoms aus dem sich das Phagolysosom entwickelt. Das Phagosom ist eine wichtige Zellorganelle, welche an der Induktion des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems beteiligt ist (Abb. 1.3.3.6.1, Stuart und Ekzekowitz 2005).

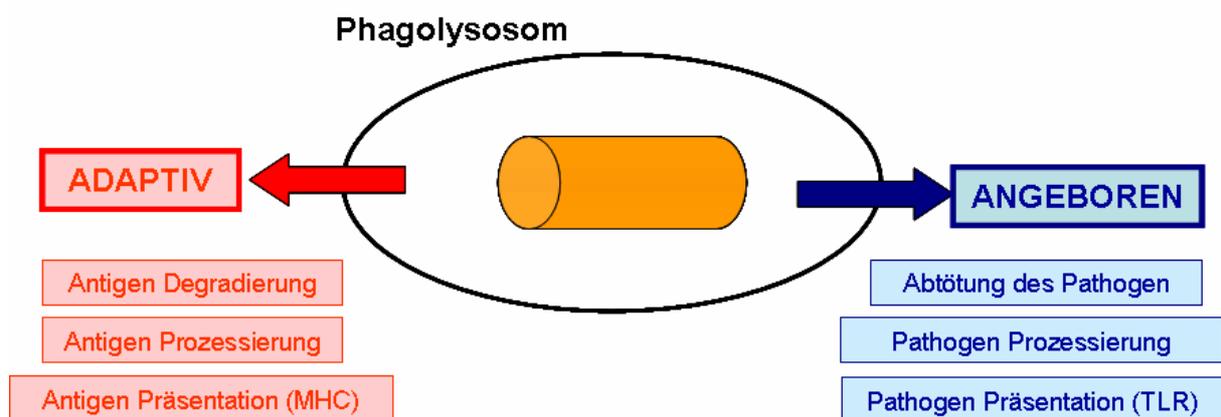


Abb. 1.3.3.6.1: Das Phagosom und die Immunantwort (verändert nach Stuart und Ezekowitz 2005).

---

## 1.4 Zielsetzung

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Aufnahmemechanismen verschiedener Partikel (DQ12, CB fein und ultrafein, TiO<sub>2</sub> fein und ultrafein, SWNT's) in alveolaren Makrophagen und die Untersuchung der daraus folgenden Konsequenzen auf die Endzündungsantwort, unter besonderer Berücksichtigung von DQ12-Partikeln. Daraus ergeben sich folgende spezifische Fragen:

- (i) *Entspricht die Partikelaufnahme einer klassischen Aktin-vermittelten Phagozytose?*
- (ii) *Wenn Quarzpartikel phagozytiert werden, welcher der klassischen Phagozytose-Rezeptoren ist dann an der Erkennung und Aufnahme dieser beteiligt?*

Resultierend aus diesen Untersuchungen soll abschließend geklärt die Frage werden:

- (iii) *Welche Bedeutung hat der Aufnahmemechanismus auf die Entzündungswirkung von Quarz?*

Nach der Etablierung von Methoden zur Bestimmung der Zelltoxizität sowie der Partikelaufnahme und der Evaluierung eines Zellsystems (siehe Kapitel 3.1) wurden die molekularen Mechanismen der Partikelaufnahme untersucht.

Für die Partikelaufnahme kommen verschiedene Mechanismen (wie z.B. klassische Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose), die von verschiedenen Proteinen reguliert werden, in Frage. Die Untersuchung, ob es sich bei der Partikelaufnahme um klassische Phagozytose unter Einbeziehung des Aktinzellskeletts handelt, sollte mit Hilfe des Aktininhibitors Cytochalasin-D durchflusszytometrisch sowie immunohistochemisch (siehe Kapitel 3.2) untersucht werden.

Im nächsten Schritt wurde der/die mögliche/n beteiligte/n Rezeptor/en ermittelt. Dazu wurden zunächst Inhibitoren der klassischen Phagozytoserezeptoren (Komplement-Rezeptor, Fc-Rezeptor, Scavenger-Rezeptor und Mannose-Rezeptor) eingesetzt. Die durch die Inhibition der verschiedenen Rezeptoren veränderte Partikelaufnahme wurde ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht. Des Weiteren wurde eine Rezeptor-Immunohistochemie zur Untersuchung der Rezeptorverteilung während der Quarzaufnahme eingesetzt. Der/die ermittelte/n für die Partikelaufnahme verantwortliche/n Rezeptor/en wurde anschließend durch eine nähere Untersuchung des phagozytotischen Signaltransduktionsweges spezifiziert. Dazu wurden Analysen des Aktivierungsstatus verschiedener an der Phagozytose beteiligter Kinasen und GTPasen durch den Einsatz von Western-Blots und Pulldown-Assays durchgeführt. Eine weitere Spezifizierung des Rezeptors erfolgte über die Inhibition verschiedener beteiligter Signalmediatoren der Phagozytose über eine erneute

durchflusszytometrischen Ermittlung der Partikelaufnahme sowie durch eine immunohistochemische Untersuchung (siehe Kapitel 3.3).

Im Anschluss daran wurde die Auswirkung der Partikelaufnahme sowie die Relevanz der daran beteiligten Mediatoren auf die Entzündungsreaktion untersucht. Dies erfolgte durch eine Analyse der Bildung von Reaktiven Sauerstoff Spezies mittels Messungen der Chemilumineszenz von Lucigenin, der durchflusszytometrischen Bestimmung der Fluoreszenz von Dihydrorhodamin und der spektroskopischen Untersuchung über Elektronen-Spin-Resonanz unter Verwendung einer Spintrap-Technik mit DMPO als Spintrap. Weiter wurde die Aktivierung des Nuclearen-Transskriptionsfaktors-(NF)- $\kappa$ B Weges und die Tumor-Necrosis-Factor- $\alpha$ -(TNF- $\alpha$ )-Freisetzung durch Western Blot, Immunohistochemie und mittels ELISA-Techniken untersucht (siehe Kapitel 3.4).

## Kapitel 2: Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien und Tiere

**NR8383** [AgC11x3A; NR8383, 1] ATCC (American Type Culture Collection), USA  
Die alveolare Ratten-Makrophagenzelllinie NR8383 wurde nahezu für alle Experimente verwendet. Es handelt sich um eine Mischkultur aus adherenten und suspendierten Zellen die aus *Rattus Norvegicus* (Sprang-Dawley) isoliert wurden. Die Zellen wurden bis zur Kultivierung in einer Mischung aus 95% Zellkulturmedium/5%DMSO bei -80°C in Stickstoff gelagert.

**A549** [A-549] ATCC (American Type Culture Collection), USA  
Mit der humanen Zelllinie A549 erfolgten Etablierungsexperimente zum MTT-Assay. Die Zelllinie stammt aus einem Bronchialepithelkarzinom der Lunge eines männlichen Kaukasen. Die Zellen wurden bis zur Kultivierung in einer Mischung aus 95% Zellkulturmedium/5%DMSO bei -80°C in Stickstoff gelagert.

**Primäre Zellen:** Alveolare Makrophagen (AM) und Interstitielle Makrophagen (IM) wurden durch Broncho-Alveolar-Lavage (BAL) und Trypsinisierung der Lunge von 8 Wochen alten weiblichen Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 260g isoliert.

**Wistar Ratten** Janvier, Le Genet St. Isle, F

#### 2.1.2 Partikel

**DQ12**, Dörentruper Quarz (Batch 6), Ø 0,96µm, gesammelt 1972 bei Robock, NRW, D

**CB**, Carbon Black fein, 260n, Ø 0,260µm

**CB**, Carbon Black ultra-fein, printex 90, Ø 0,014µm

**TiO<sub>2</sub>**, Titandioxid fein, Amatase, Ø 0,260 µm

**TiO<sub>2</sub>**, Titandioxid ultra-fein, P25, Ø 0,025µm

**SWNT**, Single Walled Nanotubes in Medium (30µg/ml), Rice-University, Houston, USA

#### 2.1.3 Chemikalienliste

- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| - 30% Acrylamidmischung                 | Roth, Karlsruhe, D              |
| - Aktivkohle                            | Merck, Darmstadt, D             |
| - Ammoniumpersulfat (APS)               | Merck, Darmstadt, D             |
| - Bicinchonische-Säure                  | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| - BSA (Bovine Serum Albumin)            | Roche, Penzberg, D              |
| - Colour-Marker (Wide Range, Low Range) | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |
| - DHR123 (Dihydrorhodamin 123)          | Molecular Probes, Leiden, NL    |
| - 2,4-Dinitrophenylhydrazin             | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA |

- DMEM (Dulbeccos modifiziertes Medium)	Gibco Invitrogen, Grand Island, USA
- DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxid)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- DNase	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Eisessig	Roth, Karlsruhe, D
- Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
- FCS (Fetal Calf Serum)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Glutamin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Giemsalösung	Merck, Darmstadt, D
- Glycin	Roth, Karlsruhe, D
- Glycerin	Merck, Darmstadt, D
- HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- HBSS ( <sup>Mg</sup> / <sub>Ca</sub> , <sup>+</sup> / <sub>+</sub> , <sup>-</sup> / <sub>-</sub> , Hanks Buffered Saline Solution)	Gibco Invitrogen, Grand Island, USA
- Immuno-Fluore Mounting Medium	MP Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
- KCl	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Kaihn's modifiziertes Medium (F12-K Nutrient Mixture)	Gibco Invitrogen, Grand Island, USA
- Kupfer(II)Sulfatpentahydrat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Saint Louis, USA
- Lucigenin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt, D
- Methanol	Roth, Karlsruhe, D
- β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium Bromid)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- NaCl	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- β-NADH	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Na-Pentobarbital (Narcoren®)	WDT, Garbsen, D
- NaOH	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco Invitrogen, Grand Island, USA
- Penicillin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Percoll	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

---

- PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt, D
- Ponceau S	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Complete Proteasen-Inhibitor-Cocktail	Roche, Penzberg, D
- Pyronin Y	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Streptomycin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg, D
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt, D
- Tris, HCl (Tris(hydroxymethyl-)aminomethan)	Roth, Karlsruhe, D
- TritonX-100	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Trypan-Blau	Biochrom, Berlin, D
- Trypsin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, US

***Inhibitoren:***

- Cyt-D (Cytochalasin-D)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Poly-I (Polyinosinic Säure)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Fucoidan	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Anti-CD32 (FcγIIIR)	BD Pharmigen™, Lincoln Park, USA
- M-α-D-MP (Methyl-α-D-mannopyranoside)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Mannan	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Anti-CD11b/c (CR)	BD Pharmigen™, Lincoln Park, USA
- Suramin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Genistein	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Lovastatin	Calbiochem, San Diego, USA
- NSC23766	Calbiochem, San Diego, USA

***Antikörper (Western-Blot):***

- anti-Rac1	Pierce, Rockford, USA
- anti-Cdc42	BD Pharmigen™, Lincoln Park, USA
- anti-Rho	BD Pharmigen™, Lincoln Park, USA
- anti-Phospho-Lyn (Tyr507)	NEB, Cell Signaling, Beverly, USA
- anti-Lyn	NEB, Cell Signaling, Beverly, USA
- anti-Phospho-Syk (Tyr323)	NEB, Cell Signaling, Beverly, USA
- anti-Phospho-Syk (Tyr525/526)	NEB, Cell Signaling, Beverly, USA
- anti-Phospho-Zap(Tyr319)/Syk (Tyr352)	NEB, Cell Signaling, Beverly, USA
- anti-Syk	NEB, Cell Signaling, Beverly, USA
- anti-p-Pi3-Kinase (Tyr508)	Santa Cruz Biotechnologies, USA
- anti-Phospho-CD32 (FcγRIIb, Tyr292)	NEB, Cell Signaling, Beverly, USA
- anti-IκBα	Santa Cruz Biotechnologies, USA

- anti- $\beta$ -Tubulin Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- anti-Maus/Kaninchen-HRP IgG Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

**Antikörper (Immunohistochemie):**

- Alexa Fluor<sup>®</sup>488Phalloidin Molecular Probes, Leiden, NL
- anti-CD32 (Fc $\gamma$ IIR) BD Pharmigen<sup>™</sup>, Lincoln Park, USA
- anti-CD11b/c (CR) BD Pharmigen<sup>™</sup>, Lincoln Park, USA
- anti-CD206 (MR) Serotec, Oxford, UK
- anti-Rac1 BD Pharmigen<sup>™</sup>, Lincoln Park, USA
- anti-NF $\kappa$ B (p65) Santa Cruz Biotechnologies, USA
- MFP488 Anti-Kaninchen IgG (H+L) Molecular Probes, Leiden, NL

**Benutzte Kit's:**

- MTS-Assay: CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous  
One Solution Cell Proliferation Assay Promega, Mannheim, D
- ECL Plus Western Blot Detektionsreagenz Amersham, Little Chalfont, UK
- EZ-Detect<sup>™</sup> Activation Kit für Rac1, Cdc42 und Rho Pierce, Rockford, USA
- TNF- $\alpha$  ELISA R&D Systems, Wiesbaden, D

**2.1.4 Geräte**

- Brutschränke Heraeus, Hanau, D
- ElektronenSpinResonanz (ESR) Spektroskop MiniScopeMS100, Magnettech GmbH, Berlin, D
- ELISA-Reader, Multiscan Ascent LabSystem, Wiesbaden, D
- Fluor<sup>™</sup>-S MultiImage BioRad, Hercules, USA
- FACSCalibur Flow Cytometer BD Bioscience Immunocytometry Systems San Jose, USA
- Kühlschränke Heraeus, Hanau, D
- MicroLumat Plus, Microplate Luminometer LB96V EG&G Berthold, Bad Wildbad, D
- Mini-Trans, Westernblot/Elektrophoreseapparatur BioRad, Hercules, USA
- Mikroskop BX60 Olympus, Hamburg, D
- Pipetten Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
- Sterilisierungsofen Gilson, Bad Camberg, D
- Sterilbank, Zellkultur Memmert, Schwabach, D
- Thermomixer Microflow, Königswinter, D
- Photometer Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
- Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D

- |                                     |                                   |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| - Vertikalschüttler, beheizbar      | Biometra, Göttingen, D            |
| - Waagen                            | Sartorius, Göttingen, D           |
| - Wasserbadsonikator, Sonorex TK 52 | Schaltech, Mörfelden-Wallorf, D   |
| -Zentrifuge                         | Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D |
|                                     | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D  |
|                                     | ThermoShandon, Dreieich, D        |

### 2.1.5 Genutzte Software

- |  |  |
|--|--|
| - Quantity One                                 | BioRad, Herkules, USA                                  |
| - Winpez/winglow                               | Microsoft, Unterschleißheim, D                         |
| - BD Cell Quest 3.3., BD Cell Quest Pro        | BD Bioscience Immunocytometry<br>Systems San Jose, USA |
| - ESR-Software                                 | Microsoft, Unterschleißheim, D                         |
| - Origin <sup>®</sup> 6.1G                     | Origin Lab Cooperation, Northampton;<br>USA            |
| - Window-XP, MS Office 2003                    | Microsoft, Unterschleißheim, D                         |
| -Adope Photoshop, Elements 3.0, Adobe Premiere | Adope Systems, USA                                     |
| - SPSS (Version 10)                            | Microsoft, Unterschleißheim, D                         |

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

- |   |   |
|---|---|
| - Zytospin-Ojekträger   | ThermoShandon, Dreieich, D                    |
| - Deckgläschen  | Menzel, D                                     |
| - 96well-Mikrotiter-Platte,<br>24well- 10mm-,60mm, 35mm Kulturplatten | Nunc, Naperville, USA                         |
| - Kulturflaschen  | Greiner, Solingen, D                          |
| - Lumi-Nunc-Platten, 96well, weißes Polysterol                        | Nunc, Naperville, USA                         |
| - Falconreaktionsgefäss   | Nunc, Naperville, USA                         |
| - Zellschaber   | Biochrom AG Seromed <sup>®</sup>              |
| - Eppendorfreaktionsgefäße  | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D              |
| - 0,20µm Filteraufsatz  | BD Pharmigen <sup>™</sup> , Lincoln Park, USA |
| - Kanüle  | BD Pharmigen <sup>™</sup> , Lincoln Park, USA |
| - Nitrocellulosemembran, Potran (0,2mm, 0,45mm)                       | Schleicher & Schüll, Dassel, D                |

### 2.1.7 Lösungen

<i>Lysepuffer-A (B)</i>	10mM HEPES 10mM KCl 1,5mM MgCl <sub>2</sub> (0,1% Nonidet P40) pH 7,9
<i>Lysispuffer-C</i>	20mM HEPES 0,45mM NaCl 1mM EDTA pH 7,9
<i>TBS(T)</i>	25mM Tris, HCl, pH7,5 150mM NaCl (0,1% v/v Tween)
<i>Laemlie-Puffer (4x)</i>	250mM Tris, HCl, pH7,6 8% (w/v) SDS 40% (w/v) Glycerin 0,04% (w/v) Pyronin Y 70µM β-Mercaptoethanol
<i>Elektrophoresepuffer</i>	25mM Tris, HCl, pH 8,3 0,2M Glycin 0,15% (w/v) SDS
<i>Transferpuffer</i>	25mM Tris, HCl 0,2 M Glycin 20%(v/v)Methanol
<i>Ponceaus-Rotlösung</i>	0,1% (w/v) Ponceau S 5% (v/v) Eisessig
<i>Strippingpuffer</i>	2% (w/v) SDS 100mM β-Mercaptoethanol 63mM Tris, HCl, pH 6,8

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturmethoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung der NR8383 Makrophagen und der A549 Epithelzellen

Die Kultivierung der alveolaren Ratten-Makrophagenzelllinie NR8383 erfolgte in Kaihn's modifiziertem Medium (F12-K Nutrient Mixture) unter Zusatz von 15% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Glutamin bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Die Umsetzung (1:4) der Flaschenkultur in der Stammkulturhaltung erfolgte alle 7 Tage. Dazu wurden die adherenten Zellen der Suspensionskultur vom Kulturgefäßboden losgeschlagen und durch auf- und abpipetieren gelöst. Nach der Zentrifugation (5min, 900g, RT) wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und zur weiteren Kulturhaltung genutzt. Zusätzlich erfolgte einmal wöchentlich ein Wechsel des Kulturmediums unter Abnahme des Mediums und Zentrifugation (5min, 900g, RT).

Die adherenten A549 Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Medium (DMEM), versetzt mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin, bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> als Flaschenkultur gehalten. Die wöchentliche Umsetzung (1:10) erforderte die Trypsinisierung (5min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) des mit PBS gewaschenen Zellenrasens. Danach wurden die Zellen in Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt ausgesät. Zweimal wöchentlich wurde zusätzlich das Medium gewechselt.

#### 2.2.1.2 Isolierung primärer Zellen

In der Regel wurden die primären alveolare Makrophagen (AM) sowie der primären Interstitiellen Makrophagen (IM) von 8 Wochen alten weiblichen Wistar-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 260g isoliert. Ausschließlich zur Untersuchung des Alterseinflusses auf das Aufnahmeverhalten erfolgte der Einsatz jüngerer Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 207g.

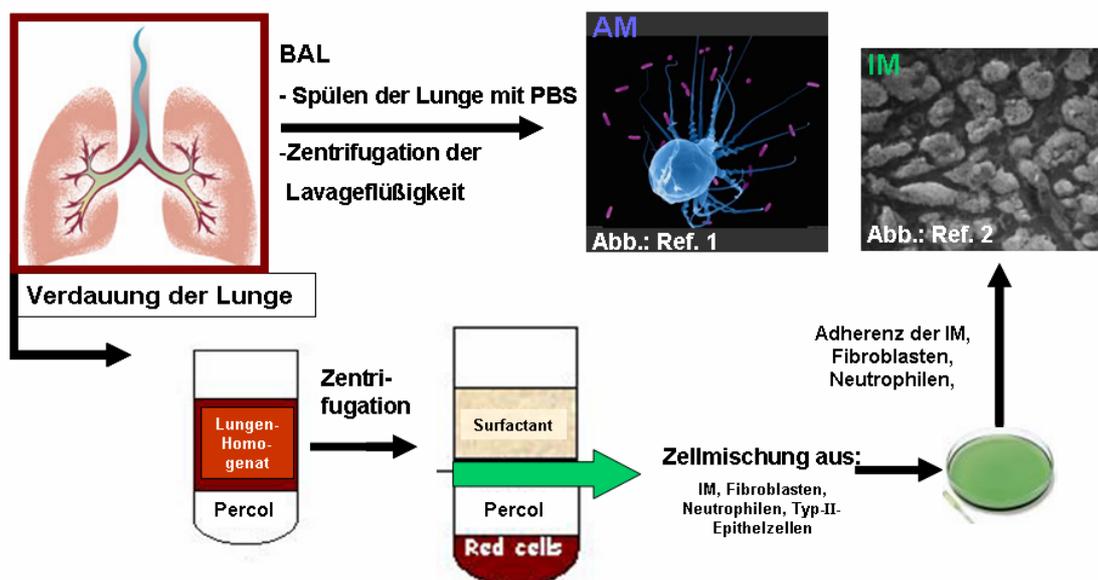
Die Tötung der Tiere erfolgte unter tiefer Anästhesie (50mg/kg Körpergewicht Nacoren, inter peritoneal) durch Entbluten über die Aorta abdominalis. Die präparierten, perfundierten Lungen wurden dann zunächst für die Broncho-Alveolar-Lavage (BAL, 5x mit je 5ml PBS) gespült. Die AM konnten dann durch Zentrifugation (10min, 800g, 4°C) der BAL-Flüssigkeit abgetrennt und nach zweifachem Waschen mit PBS und der Resuspendierung in Kulturmedium bis zur Zählung und experimentellen Aussaat (Kapitel 2.2.1.3) auf Eis gelagert werden.

Die Isolierung der primären IM erfolgte nach der Lavage über die Trypsinierung des Lungengewebes nach einer von Richards et al. (1987) beschriebenen Methode mit leichten Modifikationen (Knaapen et al. 2002). Die lavagierten Lungen wurden dazu zunächst über einem 37°C Wasserbad 30min trypsiniert, indem über eine mit der Trachea verbundene

Kanüle nach und nach, unter Nutzung des gravitationsbedingten Einstroms, 100ml Trypsin-Lösung (2,5mg/ml) pro Lunge eingeführt wurden. Die weitere Aufarbeitung der Lungen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde dafür das Lungengewebe durch kontinuierliches Zerschneiden über einen Zeitraum von 5min zerkleinert (1-2mm Stücke), wobei nach etwa der Hälfte der Zeit die Zugabe von 1ml eiskaltem FCS erfolgte. Das mit einer Lösung aus 5ml FCS und 500µl DNase (4mg/ml) versetzte und mit PBS ( $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ,  $+/+$ ) auf 20ml aufgefüllte Lungenhomogenat wurde dann nach einer Inkubation (5min/RT/unter Umschwenken), zunächst durch eine Gaze und abschließend, nach erneutem Auffüllen auf 20ml und wiederholtem durchmischen, durch einen 30µm Nylonfilter filtriert. Dadurch konnten größere Partikel entfernt werden und man erhielt nach der Zugabe von 20ml PBS ( $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ,  $+/+$ ) eine Suspension, die auf einen Percollgradienten aufgetragen werden konnte. Der Percollgradient ermöglicht die Abtrennung der im Lungenhomogenat befindlichen Zellen von anderen Lungenkomponenten, wie z.B. dem die Alveolen auskleidenden Surfactant, durch eine Zentrifugation im Dichtegradienten. Die Generierung des Percollgradienten erfolgte durch Überschichten von 10ml einer schweren (4ml 10x PBS ( $+/+$ )/10ml  $H_2O$ /26ml Percoll) mit 10 ml einer leichten (4ml 10x PBS ( $+/+$ )/25,2ml  $H_2O$ /10,8ml Percoll) Phase. Nach der Zentrifugation (20min, 800g, 10°C) konnte dann eine, die verschiedenen Lungenzellen enthaltende Lösung, aus der zwischen der Surfactant- und der Percoll-Phase liegenden Interphase isoliert werden (Abb. 2.2.1.2.1).

### Isolierung primärer Lungenmakrophagen

- Isolierung von – Alveolaren Makrophagen (AM) durch eine Broncho-Alveolar-Lavage (BAL)
- Interstitiellen Makrophagen (IM) durch Verdauung des Lungengewebes



**Abb.2.2.1.2.1:** Durchführungsschema der Isolierung primärer alveolarer und interstitieller Lungenmakrophagen (AM und IM). (Abb. Ref. 1: Aufnahmen aus Gallery of the Hubble Space Telescope, Dennis Kunkel's Microscopic World; Abb. Ref. 2: Andrew Hunt et al., Environmental Health Perspectives, Volume 111, Number 9, July 2003).

Nach Abtrennung der Zellen enthaltenden Interphase wurden die in dieser enthaltenen Zellen durch Zentrifugation (5min, 800g, 4°C) abgetrennt, mit PBS gewaschen und in DNase (4mg/ml) enthaltendem DMEM resuspendiert. Es folgte eine 60min Inkubation in 10cm Kulturschalen (Brutschrank, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>), welche die Auftrennung verschiedener Zellentypen aufgrund ihres Adhärenzverhaltens ermöglichte. Dabei heften IM, sowie ebenfalls enthaltene Neutrophile und Fibroblasten relativ schnell auf dem Kulturschalenboden an, wohingegen Typ-II-Epithelzellen nur sehr langsam adherieren. Somit konnten, nach der Inkubation, die noch suspendierten Typ-II-Epithelzellen durch Abnehmen des Überstandes abgetrennt werden. Aus der adherenten, auf dem Kulturschalenboden verbliebenen Zellfraktion erfolgte dann die Gewinnung der IM, indem die Zellen mittels eines Zellschabers vom Plattenboden gelöst wurden. Die anschließend 2fach gewaschenen (kaltes PBS; Zentrifugation, 5min, 800g, 4°C) Zellen wurde in Kulturmedium (Kaihn's modifiziertem Medium) resuspendiert und bis zur Aussaat (Kapitel 2.2.1.3) auf Eis aufbewahrt. Vor der Aussaat wurde an beiden primären Makrophagenpopulationen (AM und IM) eine Trypan-Blau-Färbung (Kapitel 2.2.2.3) zur Lebend-Tot-Diskriminierung durchgeführt. Aus der daraus bestimmten Anzahl der lebenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl konnte dann zum einen das Volumen der auszusäenden Zelllösung, der die Lebendzellzahl zugrunde gelegt wurde, sowie die Gesamtzellzahl der pro Ratte isolierten Makrophagen (pro Ratte etwa 5x10<sup>5</sup> lebende AM, bzw. 1,6x10<sup>6</sup> lebende IM) bestimmt werden. Die Auswertung einer ebenfalls durchgeführten May-Grünwald-Giemsa-Färbung (siehe Kapitel 2.2.5.2) ergab eine Reinheit von 99,8% für AM bzw. 89% für IM.

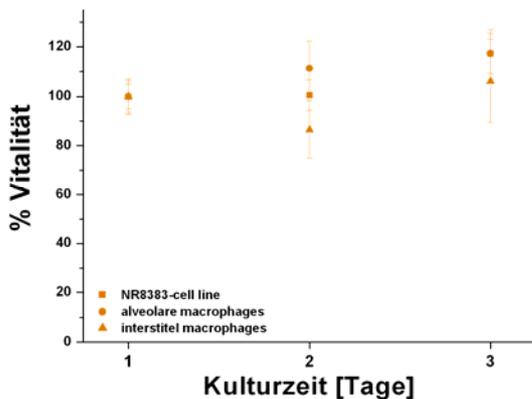
### 2.2.1.3 Aussaat der NR8383- und A549-Zellen sowie primärer AM und IM

Zur Aussaat wurde die NR8383 Suspensionskultur zentrifugiert (5min, 900g, RT) und in frischem Medium resuspendiert. Eine Lösung aus A549 Zellen konnte durch Trypsinierung (5min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) erhaltenen werden. An den so gewonnene Zelllösung wurde zunächst die Zellzahl (Zählkammer nach Neubauer) bestimmt. Dazu wurden je 4x16 Kleinquadrate ausgezählt die die Zellzahl pro ml Lösung ergab aus der das für die Aussaat einzusetzende Volumen berechnet werden konnte. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen (Zelllinien wie primäre Zellen) nach *Tabelle 2.2.1.3.1* in den, dem Experiment angepassten, Kulturschalen und Mediumsvolumina.

Experiment:	Verwendetes Kulturgefäß:	Oberfläche [cm <sup>2</sup> ]:	Lösungsvolumen [ml]:	Zellzahl X10 <sup>5</sup>
Vitalitäts-Assays (MTT, MTS, LDH)	96 well Platte	0,32	0,1	0,354
TNF-α-ELISA, Durchflusszytometrie, ESR, Lucigenin	24 well Platte	2	0,69	2,2
Durchflusszytometrie, Immunohistochemie	35mm Schalen	8,7	3,0	9,57
Western-Blot	60mm Schalen	21	7,24	23,1
Western-Blot, Pulldown-Assays	10mm Schalen	58	20,0	63,8

**Tab. 2.2.1.3.1:** Zusammenstellung der für die in den verschiedenen Experimenten eingesetzten Kulturgefäßen, Kulturschalenoberflächen, Kulturlösungsvolumina und Gesamtzellzahlen.

Bei den Makrophagenmischkulturen aus adherenten und suspendierten Zellen (NR8383 und primäre AM und IM) war, um gleich bleibende Bedingungen bei der Partikelbelastung in den verschiedenen Experimenten zu gewährleisten, besonders darauf zu achten, dass die Relationen von Kulturlösung zu Kulturschalenoberfläche zu Zellzahl konstant blieb. Daher wurden alle Experimente konstant mit  $1,1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> bzw.  $3,2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgeführt. Alle ausgesäten Zellen der Zelllinien wurden vor der Belastung zunächst über 3 Tage in Kultur gehalten. Die primären Zellen erfuhren nur eine Kultivierung über Nacht. Zum einen sollte dies den Isolationsstress eliminieren, zum anderen den zu großen Verlust von Zellen durch Absterben bei längeren Kultivierungszeiten verhindern. Vorversuche konnten jedoch zeigen, dass die primären Zellen auch länger in Kultur gehalten werden können, ohne größere Einbußen in der Zellvitalität zu erfahren. Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen keine Zellvitalitätsbeeinflussung bei einer Kulturhaltung von bis zu 3 Tagen bei den AM wie bei den IM in Vergleich mit der NR8383 Zelllinie (Abb.2.2.1.3.1).



**Abb. 2.2.1.3.1:** Vitalität (Mittelwert  $\pm$  SEM n=3, in 8 Ansätzen) primärer Makrophagen (IM, AM) im Vergleich zu NR8383 Zellen nach 1, 2 und 3 Tagen der Kulturhaltung nach der Isolation.

#### 2.2.1.4 Partikelaufbereitung, Partikelbelastung und Inhibition der Zellen

Die Belastung der Zellen mit den unterschiedlichen Partikeln erfolgte durch die Inkubation der Zellen in den Kulturschalen mit den verschiedenen Partikellösungen. Die Partikel (DQ12; CB, fein und ultra-fein; TiO<sub>2</sub>, fein und ultra-fein) wurden dazu in kleinen Aliquots von 2-20mg (je nach Experiment) eingewogen und über 16h bei 220°C gebacken, um zusätzlich zur Keimfreiheit mögliche Verunreinigungen durch Endotoxine zu eliminieren.

Aus den Partikelaliquots wurden unmittelbar vor der Belastung die jeweiligen Partikellösungen frisch angesetzt, indem sie in Medium bzw. zur Bestimmung der ROS-Generierung in HBSS (+) mit einer Konzentration von 5mg/ml suspendiert wurden. Die Herstellung der Suspension erfolgte durch eine 5min Beschallung im Wasserbadsonikator (100ml Wasser, 60Watt, 35Hz). Anschließend wurden die Partikellösungen direkt zur Belastung der Zellen eingesetzt, wobei durch vortexen in regelmäßigen Abständen ein absetzen der Partikel verhindert wurde. Die Belastung erfolgte dann, mit Ausnahme für die Vitalitäts-Assays (MTT-, MTS-, LDH-Assay) sowie dem Lucigenin-Assay, durch den Zusatz

der dem jeweiligen Reaktionsgefäß/-volumen entsprechenden Mengen der Partikellösung mit einer Konzentration von 5mg/ml (Tab. 2.2.1.4.1). Da auch hier auf die Volumenkonstanz geachtet wurde, erfolgte ein Volumenausgleich mit Medium oder HBSS<sup>(+/+)</sup>.

Experiment:	Verwendetes Kulturgefäß:	Partikel-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	Volumen zugesetzte Partikellösung [ $\mu\text{l}$ ]:	Volumen zugefügtes Medium [ $\mu\text{l}$ ]:
TNF- $\alpha$ -ELISA, Durchflusszytometrie, ESR	24 well Platte	0	-	16
		10	4	12
		20	8	8
		40	16	-
		80	32	-
Immunohistochemie, Trypan-Blau-Färbung	35mm Schalen	0	-	139,2
		10	17,4	121,1
		20	34,8	104,4
		40	69,6	69,6
		80	139,2	-
Western-Blot (I $\kappa$ B $\alpha$ )	60mm Schalen	0	-	168
		10	42	126
		40	168	-
		80	336	-
Western-Blot, Pulldown-Assays	100mm Schalen	0	-	464
		10	116	348
		40	464	-

**Tab. 2.2.1.4.1:** Konzentrationen und Volumen der in den verschiedenen experimentellen Ansätzen eingesetzten Partikellösungen und zum Volumenausgleich zugesetzten Medium bzw. HBSS<sup>(+/+)</sup>.

Die Partikelbelastung der Vitalitäts-Assays und des Lucigenin-Assays erfolgte mit einer angesetzten Verdünnungsreihe der Partikel-Suspension. Für jede Belastung wurden je 40 $\mu\text{l}$  Medium (Kontrolle) bzw. HBSS<sup>(+/+)</sup>, Lucigenin) oder frisch präparierte Partikelsuspensionen mit Konzentrationen von 0,08mg/ml (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 0,16mg/ml (20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 0,32mg/ml (40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); 0,64mg/ml (80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) zugefügt.

Die Partikelexposition der Zellen erfolgte dann durch die Inkubation über die entsprechenden Belastungszeiten im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>).

Die Inhibitionen des Aktinzytoskeletts, der Rezeptoren sowie der Kinasen und GTPasen erfolgten durch eine Vorinkubation (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) der Zellen mit den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen über 30min (bzw. 24h im Fall des Rac1-Inhibitors NSC23766). Danach wurde die Partikelbelastung wie beschrieben durchgeführt. Die eingesetzten Inhibitoren, Inhibitorkonzentrationen und -funktionen sind in *Tabelle 2.2.1.4.2* zusammengefasst. Für die kombinatorische Inhibition wurden die Zellen mit 3 bzw. 4 verschiedenen Inhibitoren gleichzeitig vorinkubiert.

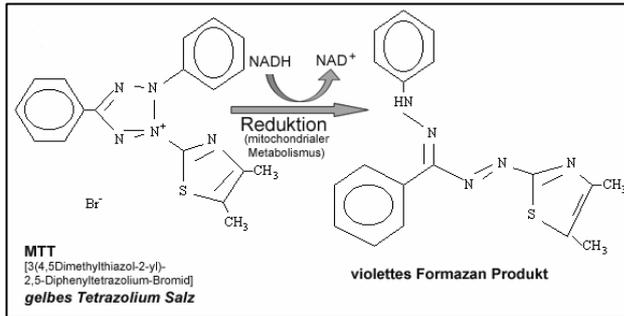
Inhibitoren:	eingesetzte Inhibitorkonzentration:	Inhibition des:
Cyt-D (Stock: 2mg/ml / DMSO)	1,5µg/ml	Zytoskelettes
Poly-I (Stock: 5mg/ml / H <sub>2</sub> O)	10µg/ml	Scavenger-Rezeptors
Fucoidan (Stock: 1mg/ml / H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup>	7µg/ml	Scavenger-Rezeptors
FcγR-Antikörper (CD32) <sup>1</sup>	1:200	Fcγ-Rezeptors
M-α-D-MP (Stock: 10mg/ml / H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup>	200µg/ml	Mannose-Rezeptors
Mannan (Stock: 10mg/ml / H <sub>2</sub> O) <sup>1</sup>	7µg/ml	Mannose-Rezeptors
CR-Antikörper <sup>1</sup>	1:200	Komplement-Rezeptors
Suramin (Stock: 10mg/ml / H <sub>2</sub> O) <sup>2</sup>	10µg/ml	P <sub>2</sub> -Purinrezeptors
Genistein(Stock: 5mg/ml / H <sub>2</sub> O) <sup>8</sup>	10, 50 µg/ml	Tyrosinkinasen
Lovastatin(Stock: 25mg/ml / DMSO) <sup>3,4</sup>	5, 10, 20, 40, 80µM	GTPasen
NSC23766(Stock: 5mg/ml / H <sub>2</sub> O) <sup>6</sup>	50, 100µM	Rac1 (GTPasen)
3er Kombination der Inhibitoren	FcγR-Antikörper (1:200) + CR-Antikörper (1:200) + M-α-D-MP (200µg/ml)	
4 er Kombination der Inhibitoren	FcγR-Antikörper (1:200) + CR-Antikörper (1:200) + M-α-D-MP (200µg/ml) + Poly-I (10µg/ml)	

**Tab. 2.2.1.4.2:** Inhibitoren und deren Konzentrationen (<sup>1</sup>O'Brien et al. 2003, <sup>2</sup>Chootip et al. 2002, <sup>3</sup>Loike et al. 2004, <sup>4</sup>Monick et al. 2003 <sup>6</sup>Gao et al.2004, <sup>7</sup>Massol et al. 1998, <sup>8</sup>Choi et al. 2003).

## 2.2.2 Bestimmung der Partikelzelltoxizität

### 2.2.2.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist eine kalorimetrische, quantitative Messmethode zur Bestimmung der Zellvitalität in Kultur. Er beruht auf der Umsetzung des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes zu violetten, wasserunlöslichen Formazan Kristallen (Abb. 2.2.2.1.1). Das mitochondriale Reduktionsprodukt kann dann, gelöst in organischen Lösungsmitteln (DMSO), spektroskopisch quantifiziert werden (Mosman 1983).



**Abb. 2.2.2.1.1:** Mitochondriale Reduktion des gelben Tetrazolium Salzes (MTT, [3(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Dimethyl-tetrazolium-Bromid]) zum violetten Formazan Produkt (verändert aus Produktkatalog Boehringer Mannheim, Cell Proliferation Kit I MTT).

Die Ausführung des MTT-Assays erfolgte an NR8383 Zellen sowie A549 Zellen (Etablierungsversuch) nach der Belastung mit unterschiedlichen Partikeln und Partikelkonzentrationen (Tab. 2.2.2.1.1, Aussaat und Belastung siehe Kapitel 2.2.1.3/4) nach 4 bzw. 24h an jeweils 8 Ansätzen in 3 unabhängigen Versuchen, falls nicht anders beschrieben. Als Partikelkontrollen dienten zusätzliche in gleicher Anzahl mit 100 µl Medium gefüllte Kulturschalen, die im weiteren Versuch wie die Zellansätze behandelt wurden. Zur Bestimmung der Inhibitortoxizität wurden die Zellen vor der Partikelbelastung mit den Inhibitoren, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, vorinkubiert.

Partikel:	Partikel-Konzentration [µg/cm <sup>2</sup> ]:
DQ12 / CB (fein) / CB (ultra-fein) / TiO <sub>2</sub> (fein) / TiO <sub>2</sub> (ultra-fein)	0
DQ12 / CB (fein) / CB (ultra-fein) / TiO <sub>2</sub> (fein) / TiO <sub>2</sub> (ultra-fein)	10
DQ12	20
DQ12	40
DQ12 / CB (fein) / CB (ultra-fein) / TiO <sub>2</sub> (fein) / TiO <sub>2</sub> (ultra-fein)	80

**Tab.2.2.2.1.1:** MTT-Assay, Partikelarten und Konzentrationen der Belastungen.

Die SWNT-Belastung musste auf eine andere Weise erfolgen, da eine 30µg/ml SWNT-Lösung in Medium von der RICE-Universität zur Verfügung gestellt wurde, mit der eine möglichst hohe Belastungskonzentration erreicht werden sollte. Die Aussaat der Zellen erfolgte daher durch eine direkte Resuspendierung der entsprechenden Zellzahl in entsprechenden SWNT-Verdünnungen (7,5; 15 und 30µg/ml in Medium). Von diesen Zelllösungen wurden dann 100µl je 96-well-Ansatz eingesetzt, um die Zellen 1, 2, 4, 8 und 16h zu belastet.

Nach den Belastungen wurden den Ansätzen je 10µl einer 5µg/ml MTT-Lösung (0,33µg/ml MTT-Endkonzentration in 150µl Lösung) zugefügt und zur reduktiven MTT Umsetzung 4h

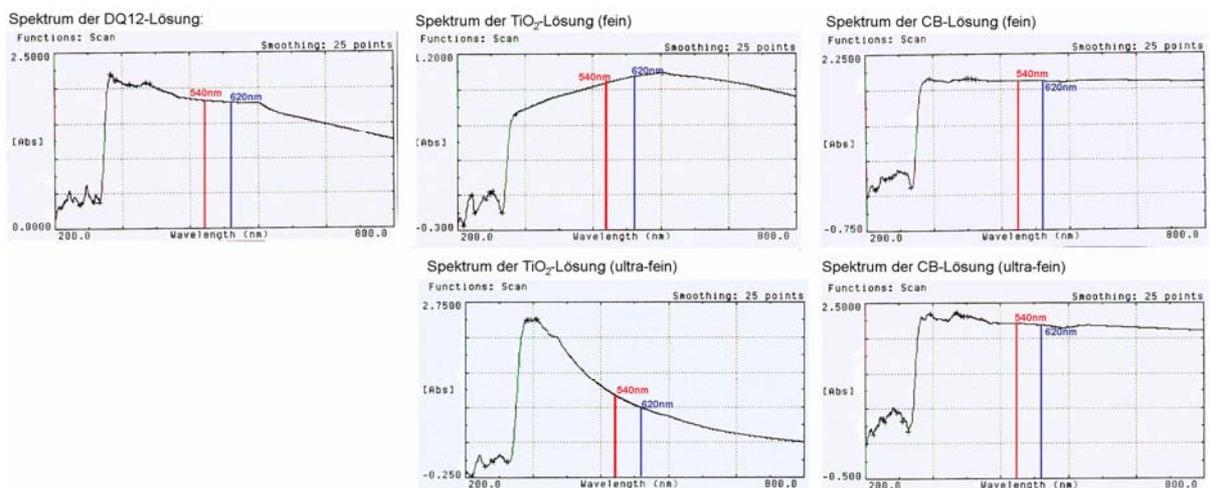
inkubiert (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Das Lösen der gebildeten Formazankristalle erfolgte dann durch den Zusatz von 150µl DMSO (1:1 Verhältnis von Lösungsvolumen : Reaktionsvolumen) und einer Inkubation über 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Abschließend wurden die optischen Dichten bei 540 und 620nm im ELISA-Reader bestimmt. Aus der Differenz der optischen Dichten (OD<sub>540nm</sub>-OD<sub>620nm</sub>) konnte dann die Vitalität nach Renwick et al. (2000) wie folgt bestimmt werden:

(1) {OD<sub>540nm-620nm</sub> (Zellen in Medium mit MTT)} - {OD<sub>540nm-620nm</sub> (Medium mit MTT)}  
**= OD X (Absorption des umgesetzten MTT der unbelasteten Zellen)**  
**≡ 100% Vitalität**

(2) {OD<sub>540nm-620nm</sub> (Partikel belastete Zellen in Medium mit MTT)}  
 - {OD<sub>540nm-620nm</sub> (Medium mit Partikeln mit MTT)}  
**= OD Y (Absorption des umgesetzten MTT der belasteten Zellen)**

(3) **Y \* 100% / X = % tuale Veränderung der Vitalität durch die Partikelbelastung**

Aus Gleichung (1) ergibt sich die OD, die beim Umsatz des MTT's in einer unbelasteten Zelle (Kontrolle) erzielt wird. Diese entspricht einer Vitalität von 100%. In Gleichung (2) wird dann die OD Y, die durch den Umsatz des MTT's in der belasteten Zelle erreicht wird, berechnet. Diese ist proportional zu der durch die Partikelbelastung veränderten Vitalität. Aus der OD Y lässt dann über die Gleichung (3) die prozentuale Veränderung der Vitalität in Relation zur Kontrolle berechnen. Die Partikelkontrollen (Partikel + Medium, ohne Zellen) sind nötig, da die Partikel im gleichen Wellenlängenbereich des gelösten Formazan absorbieren (Abb. 2.2.2.1.2). Sowohl DQ12, TiO<sub>2</sub> (fein und ultra-fein) als auch CB (fein und ultra-fein) zeigen eine Absorption bei der MTT-Meßwellenlänge von 540nm (rot) und 620nm (blau). Der Einfluss der Partikelabsorption auf die optische Dichte im Messbereich des MTT-Assays muss also berücksichtigt werden um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse zu



**Abb. 2.2.2.1.2:** Absorptionsspektren der Partikellösungen (80µg/cm<sup>2</sup>) in Medium von DQ12, TiO<sub>2</sub> (fein, ultra-fein) und CB (fein, ultra-fein) im sichtbaren Spektralbereich.

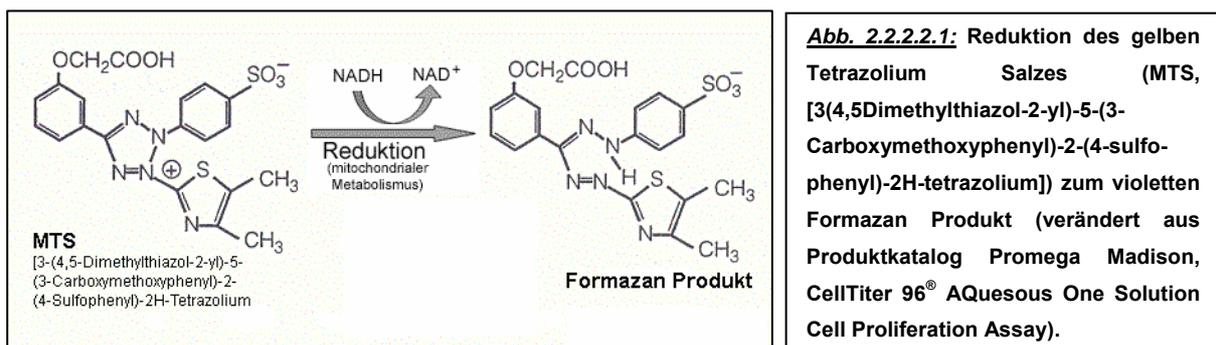
vermeiden. Zu diesem Zweck wird die Absorption der Partikel anhand der Partikel-Medium-Kontrollen ( $\{OD_{540nm} - OD_{620nm} \text{ (Medium mit Partikel und MTT)}\}$ ) ermittelt. Aus der Differenz der Test-Absorption ( $\{OD_{540nm} - OD_{620nm} \text{ (partikelbelastete Makrophagen in Medium mit MTT)}\}$ ) und der Partikelabsorption kann dann die Vitalität der belasteten Zellen berechnet werden ohne von der Partikelabsorption beeinflusst zu sein.

Die Experimente zur Etablierung des MTT-Assays nach Dias et al. (1999) erfolgten an unbelasteten Zellen. Nach der Wachstumsperiode von 3 Tagen wurde den Ansätzen je 40µl Medium und 10µl verschiedenen konzentrierter MTT-Lösungen (2,5, 5 und 10µg/ml; mit MTT-Endkonzentration von 0,16, 0,33 und 0,66µg/ml in 150µl Lösung) zugegeben. Nach einer Inkubation von 4h (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) und der DMSO-Zugabe (150µl) gefolgt von einer weiteren 1h Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) erfolgte die Messung der optischen Dichten bei 540 und 620nm nach 0,5, 1, 2, und 16h im ELISA-Reader. Dadurch ließ sich die Veränderung der Absorption durch das gebildete Formazan über die Zeit verfolgen. Die Differenzen der optischen Dichten ( $OD_{540nm} - OD_{620nm}$ ) wurden dann für die verschiedenen DMSO-Inkubationszeiten gegen die MTT-Lösungskonzentration aufgetragen und über einen Student-*t*-Test statistisch ausgewertet.

Für das Zellgradienten-Experiment wurden 2, 3, 4 und  $5 \times 10^5$  Zellen pro Kulturschale ausgesät und wie bereits beschrieben nach 3 Kulturtagen ohne Partikelbelastung mit 40µl Medium, 10µl MTT-Lösung (5µg/ml) und 150µl DMSO weiterbehandelt. Einer anschließenden Erfassung der Messwerte im ELISA-Reader folgte die Auswertung bei der aus der Auftragung der Absorptionen gegen die Zellzahl der lineare Regressionskoeffizient ermittelt wurde.

### 2.2.2.2 MTS-Assay

Als nächstes wurde die Vitalität durch einen MTS-Assay untersucht. Dieser Assay beruht auf demselben Prinzip wie der MTT-Assay. Eine Tetrazoliumkomponente (MTS) wird durch Reduktion in ein Formazan Produkt umgesetzt (*Abb. 2.2.2.2.1*). Allerdings ist bei dieser Variante auch das Formazanprodukt wasserlöslich, sodass das Endprodukt nicht in einem weiteren Schritt in einem organischen Solvent gelöst werden muss. Vorteil des MTS-Assays ist also seine Konzeption als Vitalitätstest in einem Lösungsansatz.



Der MTS-Assay wurde mit dem Promega kit: CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay durchgeführt. Jeder der 3 unabhängigen Experimente erfolgte mit 8 Ansätzen unter Verwendung von Partikelkontrollen, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. an NR8383 Zellen. Nach Aussaat (siehe Kapitel 2.2.1.3) und Partikelbelastung (siehe Kapitel 2.2.1.4) über 4 und 24h wurde den Proben je 20µl CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Reagenzes zugesetzt und über 4h (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) zur Reduktion des MTS inkubiert. Abschließend konnte durch die Messung der optischen Dichte bei 540nm im ELISA-Reader, die Vitalität berechnet werden (siehe Kapitel 2.2.2.1).

### 2.2.2.3 Trypanblaufärbung

Die Trypanblaufärbung ist ein Toxizitätstest, der auf der Inklusion eines Farbstoffs beruht. Trypanblau, ein nicht-zellmembranpermeabler Farbstoff, kann die Zytoplasmamembran nur durchdringen, wenn sie durch die toxische Wirkung einer Substanz geschädigt wurde. Die geschädigten Zellen können dann unter dem Mikroskop anhand ihrer Blaufärbung ausgezählt werden, woraus sich dann im Verhältnis zur Gesamtzellzahl die Vitalität berechnen lässt.

Die Trypanblaufärbung erfolgte an NR8383 Zellen, die in 35mm Schalen (siehe Kapitel 2.2.1.3/4) ausgesät und mit unterschiedlichen Partikeln bei verschiedenen Konzentrationen (Tab. 2.2.1.4.1) belastet wurden. Die Präparation der Zellen erfolgte nach der Belastung (4 und 24h) indem die adherenten Zellen mittels eines Zellschabers vom Kulturschalenboden gelöst und mit der suspendierten Zellfraktion zentrifugiert (800g bei 4°C 10min) wurden. Die 2fach mit eiskaltem PBS gewaschenen Zellen wurden dann in einer Verdünnung von 1:20 in die Trypanblaufärbung eingesetzt. Dazu wurden jeweils 10µl der Zelllösungen mit 100µl PBS und 90µl Trypanblau versetzt und auf eine Zählkammer nach Neugebauer aufgetragen. Die Zellfärbung konnte dann durch die Auszählung von je 4x16 Kleinquadrate der Zählkammer unter Berücksichtigung von gefärbten, toten und ungefärbten, lebenden Zellen am Mikroskop (10 x 20fache Vergrößerung) ausgewertet werden. Aus der Anzahl der ausgezählten lebenden und der Gesamtzellzahl erfolgte die Berechnung der Vitalität unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors von 20 wie folgt:

$$(4) \{ \text{Anzahl der ungefärbte Zellen (Kontrolle)} / \text{Gesamtzellzahl (Kontrolle)} \} * 20$$

$$= X \text{ Anteil lebender Zellen in der Kontrolle} \equiv \mathbf{100\% \text{ Vitalität}}$$

$$(5) \{ \text{Anzahl der ungefärbte Zellen (staubbelastet)} / \text{Gesamtzellzahl (staubbelastet)} \} * 20$$

$$= Y \text{ Anteil lebender Zellen nach der Staubbelastung}$$

$$(6) Y * 100\% / X = \% \text{ tuale Veränderung der Vitalität durch die Staubbelastung}$$

### 2.2.2.4 LDH-Assay

Abschließend wurde der LDH-Assay, der wie die Trypanblaufärbung auf der Zerstörung der Zellmembran beruht, zur Untersuchung der Zelltoxizität eingesetzt. Im Gegensatz zur genutzten Farbstoffinklusion wird im LDH-Assay die Freisetzung des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) durch die zerstörte (leckende) Zellmembran gemessen. LDH, ein zytosolisches Protein, für welches die Plasmamembran der intakten Zelle nicht permeable ist kann nach Schädigung dieser die Membran passieren. Die Menge des in die extrazelluläre Flüssigkeit entwichenen Enzyms ist proportional zur durch eine Substanz verursachten Zellschädigung und steht somit im direkten Verhältnis zu ihrer Zelltoxizität (Rae 1975).

Die Untersuchung der LDH-Freisetzung erfolgte an NR8383 Zellen, die wie im MTT-Assay beschrieben (siehe Kapitel 2.2.1.3 und 2.2.1.4) ausgesät und belastet wurden. Als Positivkontrolle diente zusätzlich die Inkubation mit 200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 und 24h, bei 37°C ,5% CO<sub>2</sub>). Jeder Versuch wurde mit 8 Ansätzen in 3 unabhängigen Experimenten ausgeführt. Der LDH-Assay wurde an den gekühlten Überstände (8°C), um weitere Reaktionen zu unterbinden unmittelbar oder nach 1Tag durchgeführt. Dafür wurde zunächst zur Erstellung einer Standardkurve eine 1mg/ml β-NADH-Lösung in Natriumpyruvat (0,75mM in aqua<sub>dest</sub>) frisch angesetzt und nach dem Schema in *Tabelle 2.2.2.4.1* verdünnt.

β-NADH / Pyruvat	aqua <sub>dest</sub> (µl)	LDH-Aktivität(U/ml)
500	50	0
400	150	280
300	250	640
200	350	1040
100	450	1530
50	500	2000

**Tab. 2.2.2.4.1:** Pipetierschema der Standards zur Auswertung des LDH-Assays.

Für eine Dreifachbestimmung der Standardkurve wurden auf eine 96 well Kulturplatte je 20µl Medium pipetiert. Die Bestimmung des LDH-Gehalts der Proben erfolgte durch die zellfreie Auftragung von jeweils 20µl des Probenüberstandes auf dieselbe Mikrotiterplatte. Anschließend wurde die Platte, nachdem die Wells mit dem Medium mit jeweils 50µl der Standardlösungen, die der Proben mit je 50µl Natriumpyruvatlösung (0,75mM in aqua<sub>dest</sub>) versetzt waren, nach dem Durchmischen auf dem ELISA-Reader für 30 min bei 37°C dunkel inkubiert. Nach der enzymatischen Umsetzung (Pyruvat + NADH → Lactat(+) +NAD(+)) durch die Lactat Dehydrogenase erfolgte die Zugabe von 50µl einer 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (0,2mg/ml in 1N HCl) in jedes Well. Nach erneuter Inkubation (RT, dunkel, 20min) konnte durch Zugabe von 50µl NaOH (4N) beim Durchmischen auf dem ELISA-Reader und durch eine weitere Dunkelinkubation (RT, 5min) eine Farbentwicklung erzielt werden, die durch die Messung der Absorption bei 540nm mittels des ELISA-Reader quantifiziert wurde. Die gemessenen optischen Dichten dienten nun der Berechnung der LDH-Konzentration in den Überständen, welche proportional zur Vitalität sind. Dazu wurde zunächst aus den gemittelten Absorptionen der Standards die Standardkurve aufgetragen.

Anhand der, durch eine lineare Regression gewonnenen Parameter der Geradengleichung:  $y_n = A + B \cdot x_n$  (A = Ordinaten Schnittpunkt, B = Steigung der Geraden) konnte durch einsetzen der optischen Dichten der Proben ( $y_n$ ) die LDH-Freisetzung ( $x_n$ ) nach Gleichung (7) berechnet werden. Die Ergebnisse wurden anschließend auf die Kontrolle normiert (Gleichung 8) und gegen die Konzentration aufgetragen.

$$(7) x_n = \frac{y_n - A}{B} = \text{LDH-Freisetzung in U/ml}$$

$$(8) x_n \cdot 100\% / x_{\text{Kontrolle}} = \% \text{ LDH}$$

### 2.2.2.5 Statistische Analysen

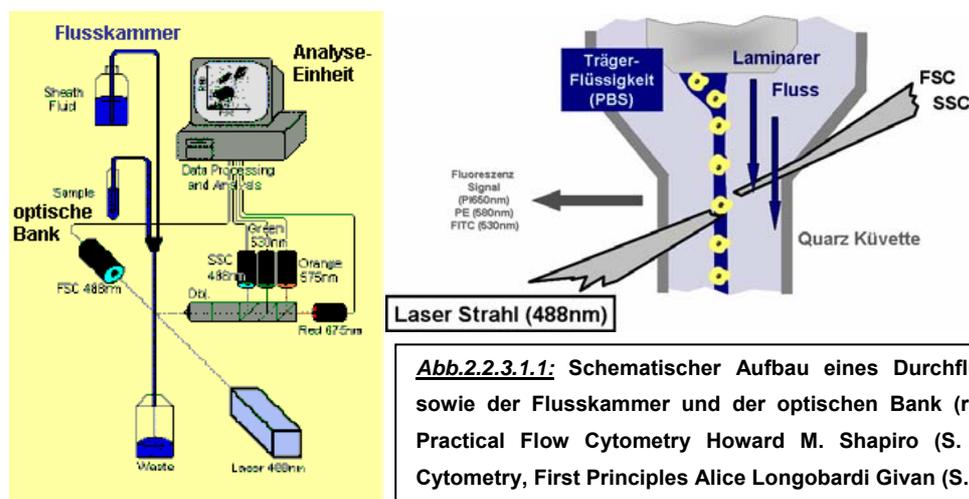
Die Ergebnisse aller Vitalitätsuntersuchungen sowie der Etablierungsexperimente wurden mit dem Student-*t*-Test unter Verwendung des Programms Origin auf Signifikanz untersucht.

## 2.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Partikelaufnahme

### 2.2.3.1 Messtechnik

Bei der Durchflusszytometrie werden die Charakteristika von Zellen oder anderen Partikeln untersucht, indem sie das Durchflusszytometer in einem Flüssigkeitsstrom passieren.

Ein Durchflusszytometer besteht aus einer Flusskammer, einer optischen Bank und einer Analyse-Einheit (Abb.2.2.3.1.1). Zellen in Suspension werden durch die Passage der Träger- oder Scheideflüssigkeit vereinzelt. Dabei fließt die Probenflüssigkeit als laminarer Strom durch einen zentralen Kern, der sich nicht mit der Scheideflüssigkeit durchmischt. Die Zellen werden hydrodynamisch fokussiert. Die vereinzelt Zellen passieren dann nacheinander die optische Bank bestehend aus einem bzw. zwei Laserstrahlen.

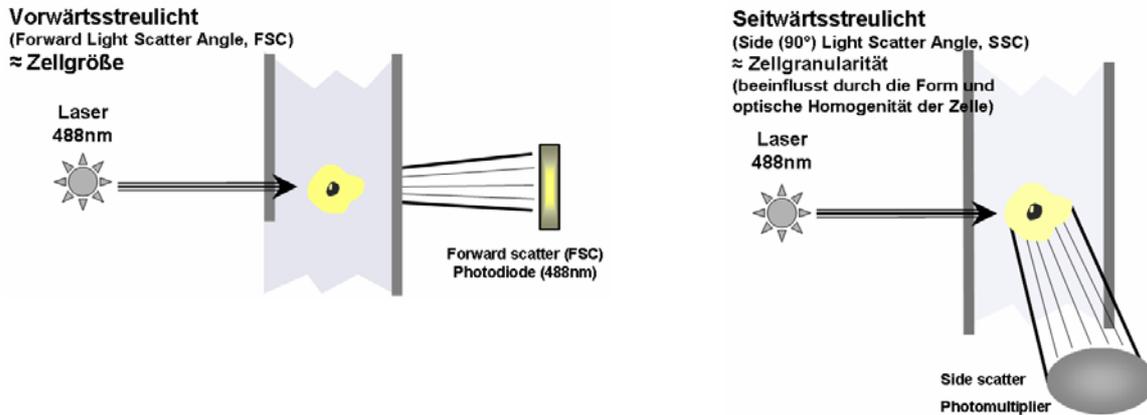


**Abb.2.2.3.1.1:** Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (links) sowie der Flusskammer und der optischen Bank (rechts), verändert aus Practical Flow Cytometry Howard M. Shapiro (S. 159, 167) und Flow Cytometry, First Principles Alice Longobardi Givan (S. 23, 25).

Bei dem für die Untersuchungen der Partikelaufnahme sowie zur Analyse der ROS Generierung verwendete Durchflusszytometer handelt es sich um ein BD FACSCalibur Flow Cytometer. Sein optisches System besteht aus zwei Lasern. Einem Argonlaser der Licht mit einer Wellenlänge von 488nm erzeugt, und einem seitlich zugeschalteten roten Diodenlaser, der Licht einer Wellenlänge von 635nm ausstrahlt. Das Licht des Argonlasers wird von den Zellen ohne Veränderung der Wellenlänge in vorwärts und seitwärts Richtung gestreut (Abb. 2.2.3.1.2).

Das Vorwärtsstreuung (Forward Light Scatter Angle, FSC), auch als Volumen oder Größensignal bezeichnet, ist das Licht, welches in Richtung der Lichtquelle gestreut wird. Es wird von einem Photodetektor gemessen und steht in Relation zur Größe und zum Volumen der Zelle. Weiterhin ist es abhängig vom Refraktionsindex der Zelle. Das Seitwärtsstreuung (Side (90°) Light Scatter Angle, SSC) wird von einem der im rechten Winkel zur Lichtquelle des einfallenden Lichts stehenden Photomultiplier des Durchflusszytometers gemessen. Detektiert wird das Licht, welches von der Zelloberfläche seitlich gestreut wird. Je irregulärer oder granulärer eine Zelle oder Partikel ist, desto höher ist die Intensität des unter einem Winkel von 90° gestreuten Lichts. Der SSC ist abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit, der internen Struktur sowie der Größe und Form der Zelle oder des Partikels. Er wird auch

als Granularitäts- oder orthogonales Licht-Streu-Signal bezeichnet (Alice Longobardi Givan S.27-29).



**Abb.2.2.3.1.2:** Schematische Darstellung des Vorwärts- und Seitwärts- Streulichts. verändert aus Flow Cytometry, First Principles Alice Longobardi Givan (S. 23, 25).

Während die Streulichtintensitäten, die durch den FSC-Detektor und SSC-Photomultiplier gemessen werden, von den physiologischen Charakteristika der Zelle abhängen, liegen im BD FACSCalibur 4 weitere Photomultiplier vor, die das Fluoreszenzlicht einer Färbung, welches von der Zelle emittiert wird, detektieren. Diese Fluoreszenzdetektoren (FL1, FL2, FL3) stehen ebenfalls im rechten Winkel zum einfallenden Licht des Argonlasers. Mit ihnen können Emissionen von 500-530nm (FL1, z.B. FITC, GFP, DHR), 543-627nm (FL2, z.B. Phytoerythrin) und > 650nm (FL3, z.B. Propidium Jodid) gemessen werden. Der Photomultiplier FL4 detektiert Emissionen in einem Wellenlängenbereich von 645-676 (z.B. Cy5), die durch den Diodenlaser angeregt werden. Mit diesem Durchflsszytometer-Typ können also bis zu 6 Parameter (FSC, SSC, FL1-4) gleichzeitig gemessen werden. Während die gemessene Fluoreszenzintensität logarithmisch verstärkt wird, werden FSC- und SSC-Signal meist linear verstärkt. Die FSC-Photodiode hat 5 Verstärkungsstufen, die je nach Zellgröße verwendet werden (E00, E01, E02, E03 für Zelldurchmesser von 5-10µm] und E-1 [Zelldurchmesser: 15-30µm]). Alle anderen Detektoren können auf Verstärkungen zwischen 150 und 1000 Volt eingeregelt werden. Alle im Folgenden verwendeten Detektorparameter sind in *Tabelle 2.2.3.1.1* zusammengefasst.

Detektor:	Voltage:	AmpGain:	Mode:
FSC	E00	1,00	Linear
SSC	350	1,00	Linear
FL1 (DHR)	480	1,00	Logarithmisch

**Tabelle 2.2.3.1.1:** Detektorparameter Einstellungen zur Messung der Partikelaufnahme und DHR-Fluoreszenz.

Zur Bestimmung der Partikelaufnahme wurde der FSC und SSC als Maß der Größe und Granularität ungefiltert aufgenommen (Kapitel 2.2.6.1.2). Die Ermittlung der ROS Generierung erforderte die zusätzliche ungefilterte Detektion des FL1Heights als Maß der

DHR-Fluoreszenz. Analysiert wurden dabei jeweils 10.000 Zellen. Evaluierungsversuche mit einer höheren Zellzahl zeigten keinen Einfluss dieser auf die Ergebnisse.

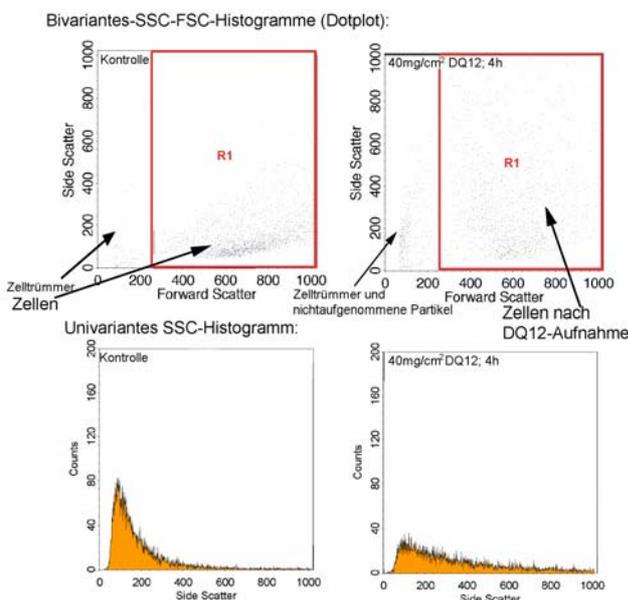
### 2.2.3.2 Praktische Durchführung

Die Untersuchung der Partikelaufnahme erfolgte jeweils in 3 Ansätzen durch mindestens 3 unabhängige Experimente. Dazu wurden die Zellen, wie in den Kapiteln 2.2.1.3/4 beschrieben ausgesät und über 1, 2, 4 oder 24h belastet. Die Inhibitionsstudien (Kapitel 2.2.1.4) wurden bei Belastungszeiten von 1h bzw. 4h ausgeführt. Nach der Belastung wurden die adherenten Zellen der verschiedenen Ansätze auf Eis mittels eines Zellschabers von den Kulturschalen gelöst und mit der suspendierten Zellfraktion in Falconreaktionsgefäße überführt. Die Zellen der Suspensionen wurden dann durch Zentrifugation (800g, 4°C, 10min) und 2fachem Waschen mit je 1ml eiskalten HBSS(Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; /.) für die durchflusszytometrische Messung präpariert. Das abschließend in 400µl HBSS (/.) aufgenommene und resuspendierte Zellpellet wurde dann bis zur durchflusszytometrischen Messung unter den bereits beschriebenen Parametern auf Eis maximal über 2h gelagert.

### 2.2.3.3 Datenanalyse

Die Datenerfassung und Analyse erfolgte mit der Software BD Cell Quest 3.3. Alle Abbildungen wurden mit der Software BD Cell Quest Pro erstellt. Die aufgenommenen Daten wurden als bivariantes (Dotplot) oder als univariantes Histogramm dargestellt. Des Weiteren wurde die Möglichkeit zur Darstellung verschiedener Proben in einem Überlagerungsdiagramm (Overlay) genutzt. Dabei können die Kanäle der Parameter entweder auf einer linearen Skala mit 1024 Kanälen (meist für SSC und FSC) oder logarithmisch mit Dekaden von 0-10.000 abgebildet werden. Im Dotplot (korrelierte Zweiparameterdarstellung) werden zwei gemessene Parameter gegeneinander aufgetragen. Am Schnittpunkt der beiden Mess-Signale erscheint ein Punkt. Werden z.B. FSC und SSC zur Erstellung eines Dotplots aufgetragen, erscheinen Zellen mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften (ähnlicher Granularität und Größe) als Wolke (Abb. 2.2.3.3.1), die im bivarianten Histogramm des FSC gegen den SSC von unbelasteten NR8383 Zellen zu beobachten ist. Werden die Zellen mit Partikeln belastet, verändert sich die Granularität der Zellen, die einen oder mehrere Partikel aufgenommen haben. Sie erscheinen bei einem höheren SSC-Signal (Stringer et al 1995, Palacenda et al 2000). Die Dichte der sich vergrößernden Zellwolke nimmt ab. Im vorderen Bereich des Dotplots erscheinen nach der Belastung mit Partikeln neben Zelltrümmern auch nicht aufgenommene Partikel. Zelltrümmer wie auch freie Partikel wurden durch elektronisches Filtern (Gaten) von der Auswertung ausgeschlossen. Das elektronische Gate (R1) erfasst dann nur noch die SSC-Signale der Zellen, die in einem gefilterten univarianten SSC-Histogramm aufgetragen werden. Das

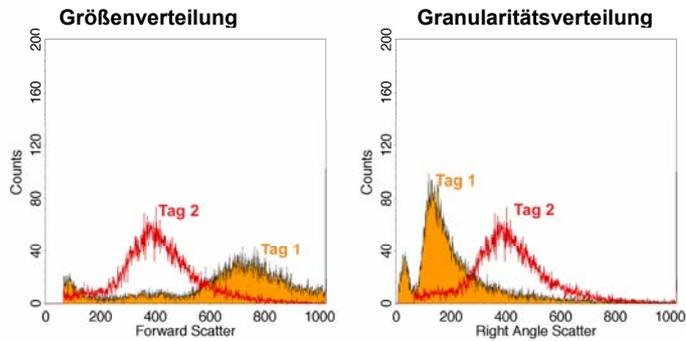
univariante Histogramm (gated) gibt die Verteilung eines gemessenen Parameters (hier der Zellgranularität) wieder. Auf der Abszisse können die Kanäle als lineare Skala mit 1024 Kanälen oder logarithmisch mit Dekaden von 0-10.000 abgebildet werden. Auf der Ordinate ist das Mess-Signal, auf der Abszisse die Anzahl der Mess-Signale aufgetragen. Das univariante Histogramm gibt also eine Verteilung, hier der Granularität in der Zellpopulation, wieder. Im Vergleich ist zu erkennen, dass sich die Granuläritätsverteilung der Zellen durch die Belastung verändert. Die Verteilung wird breiter und das Maximum verschiebt sich zu höheren Werten. Aus diesen Histogrammen wurde der Median des SSC für die verschiedenen Partikelbelastungen ermittelt, der als Maß zur Bestimmung der Partikelaufnahme eingesetzt wurde.



**Abb. 2.2.3.3.1:** Charakteristische durchflusszytometrische bivariate SSC-FSC-Histogramme (oben) und univariante SSC-Histogramme (unten) unbelasteter (links) und mit 40mg/cm<sup>2</sup> über 4h belasteter Zellen (rechts), die zur Ermittlung der Partikelaufnahme eingesetzt wurden. Auf der Abszisse des Dotplots ist der Forward Scatter Angle (FSC) und auf der Ordinate der Side Scatter Angle (SSC) abgebildet. Im univariante Histogramm ist als Abszisse die lineare Skala der 1024 SSC-Kanäle und als Ordinate das Messsignal des SSC's aufgetragen.

Zur Quantifizierung des zur Aufnahme proportionalen SSC-Signals wurde der Median des SSC der verschiedenen Partikelbelastungen bestimmt. Gegenüber dem Mittelwert bietet er den Vorteil, dass er nicht so anfällig für Abweichungen zu sehr großen und/oder kleinen Messwerten ist. Der aus den Einzelwerten des Medians berechnete Mittelwert wurde anschließend auf den Wert der Kontrolle normiert (Kontrolle  $\equiv$  100%) und gegen die Partikelbelastung und/oder die Belastungszeit aufgetragen. Die statistische Datenanalyse erfolgte mit der Software SPSS (Version 10) über eine Varianzanalyse unter Verwendung eines Konfidenzintervalls von 95%. Da die Zellgröße einen starken Einfluss auf die Eigenschaften der Makrophagen (Haugen et al. 1999) hat und zudem in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass die Größe wie auch die Granularität der Makrophagen von Versuchstag zu Versuchstag, selbst unter genauer Beibehaltung der Versuchsbedingungen, stark variiert, wurde der FSC (als Maß für die Größe) als Kovariante mit in die Signifikanzanalyse einbezogen.

Abb. 2.2.3.3.2 zeigt die Ergebnisse von Messungen des FSC bzw. SSC an zwei verschiedenen Versuchstagen in einem Overlay. In den univariaten FSC- und SSC-Histogrammen ist an der Verschiebung der Maxima der Größen- (links) als auch der Granularitäts- (rechts) Verteilung die hohe Variabilität dieser Parameter an verschiedenen Versuchstagen zu verfolgen.



**Abb. 2.2.3.3.2:** Das univariante FSC (Forward Scatter Angle) -Histogramm (links) und das univariante SSC (Side Scatter Angle) -Histogramme (rechts) unbelasteter Zellen zeigt die Varianz der Größe und der Granularität in Abhängigkeit vom Tag der Messung.

## 2.2.4 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

### 2.2.4.1 Zelllyse

Die Zellen zur Untersuchung der GTPasen- und Kinasen-Aktivität wurden in 100mm-Kulturschalen, die der IκBα-Degradierung in 60mm-Kulturschalen wie in Kapitel 2.2.1.3 und 2.2.1.4 beschrieben ausgesät und belastet. Nach der Präparation erforderte die Verwendung der Zelllysate für die verschiedenen experimentellen Ansätze eine entsprechende Lyse der Zellen.

Die Untersuchung der GTPase- und Kinasen-Aktivität erfolgte an denselben Lysaten. Für die Lyse wurde der dem EZ-Detect™ Activation Kit beigegefügte Lyse-/Bindungs-/Waschpuffer verwendet. Nach der DQ12-Belastung (5, 10, 15 oder 60min) wurden die Zellen auf Eis mit einem Zellschaber aus den Kulturgefäßen gelöst und 2fach mit je 10ml eiskaltem TBS gewaschen. Die Lyse erfolgte durch die Resuspension des aus der abschließenden Zentrifugation (800g, 4°C, 10min) erhaltenen Zellpellets in 800µl Lysis-Puffer, versetzt mit Proteaseinhibitor (1Tablette/12ml Lysis-Puffer), in einer 5min Inkubation auf Eis. Nach der Lyse konnten die Proteinlysate durch Zentrifugation (16.000g, 15min, 4°C) isoliert werden. Die Überstände wurden in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt und unmittelbar nach der Proteinbestimmung für die Präzipitation eingesetzt. Das übrige Lysat wurde, für die Kinase- und die Total-GTPase Untersuchungen, auf flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Untersuchung der Degradierung des zytosolständigen IκBα erfolgte an Lysaten einer subzellularen Proteinextraktion. Dafür wurden die Zellen nach einer 60min DQ12-Belastung auf Eis durch einen Zellschaber aus den Kulturgefäßen gelöst und zunächst mit PBS (2fach mit je 5ml / Zentrifugation mit 800g, 4°C, 10min) gewaschen. Die Lyse des zytosolischen Zellkompartiments erfolgte am gewonnenen Zellpellet durch die Resuspendierung in 300µl Lysispuffer-A, versetzt mit Proteaseinhibitor (1 Tablette/10ml Lysispuffer-A), einer 15min Inkubation auf Eis, gefolgt von der Zugabe von 37,5µl Lysispuffer-B (10ml Lysispuffer-B mit 1 Proteaseinhibitortablette), wodurch die Nukleusstruktur unzerstört blieb. Das zytosolische Lysat konnte dann nach vorsichtigem Mischen durch Umschwenken in einer nachfolgenden Zentrifugation (3200g, 4°C, 10min) isoliert werden. Das verbliebene Pellet wurde nach Abnahme des Überstands mit 75µl Lysispuffer-C (1 Proteaseinhibitortablette/10ml Lysispuffer-C) versetzt und vor dem Zentrifugieren (13.000g, 4°C, 10min) im Eisbad unter Rotieren 15min inkubiert. Dadurch konnte die Kernmembran lysiert und das nukleare Lysat aus dem Überstand gewonnen werden. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Lysate auf flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Einsatz im Western Blot bei -80°C gelagert.

#### 2.2.4.2 Proteinbestimmung mit Bicinchonnischer-Säure

Um einen gleichmäßigen Proteineinsatz im anschließenden Western Blot oder Pulldown-Assay zu gewährleisten, mussten zunächst die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt werden. Die Bestimmung der Lysatproteinkonzentration erfolgte anhand einer BSA-Standardkurve (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 und 0,03125mg/ml). Dabei wurde eine BSA-Stocklösung (2mg/ml) mit dem entsprechenden Lysispuffer verdünnt und je 10µl dieser Standardlösungen für eine 3fach Bestimmung sowie je 10µl der 1:10 verdünnten Proben für eine Doppelbestimmung auf eine 96well-Mikrotiter-Platte aufgetragen. Nach der Zugabe von je 200µl einer Mischung aus Kupfer(II)Sulfatpentahydrat und Bicinchonnischer-Säure im Verhältnis 1:50 folgte eine Inkubation über 30min bei 37°C. Die Proteinkonzentration konnte dann aus den im ELISA-Reader gemessenen optischen Dichten bei 540nm über die Standardkurve ermittelt werden.

#### 2.2.4.3 Pulldown-Assay (Affinitätspräzipitation aktivierter GTPasen Rac1, Cdc42, Rho)

Die Präzipitation wurde mit dem EZ-Detect™ Activation Kit für Rac1, Cdc42 und Rho durchgeführt. Eine Positivkontrolle stellten Lysatproben dar, deren GTPasen extrazellulär mit GTPγS umgesetzt worden waren. Der extrazelluläre Umsatz erfolgte an 500µl unbelastetem Lysat unter Zusatz von 10µl 0,5M EDTA (pH 8,0) und 5µl 10mM GTPγS und einer 15min Inkubation bei 30°C. Die Umsetzung der inaktiven GDP gebundenen GTPase-Form zur aktivierten GTP gebundenen Form über den Austausch von GDP durch GTP wurde durch die Zugabe von 32µl einer 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung gestoppt. Von den Reaktionsprodukten konnten dann jeweils 200µl in die Präzipitationen der Positivkontrollen der verschiedenen GTPasen (Rac1, Rho und Cdc42) eingesetzt werden. Die Präzipitation der aktivierten GTPasen in den Lysaten der Kontrollen und der belasteten Zellen (15, 60min; 10, 40µg/cm<sup>2</sup> DQ12) erfolgte jeweils an einer 500µg Protein entsprechenden Lysatmenge.

Je Probenansatz wurde für die Präzipitation eine SwellGel®-immobilisierter-Glutathion-Disc in das Sammelgefäß des Zentrifugenröhrchens vorgelegt und mit 20µg GST-human Pak1PBD (Rac1 und Cdc42) bzw. 400µg GST-Rhotekin-RBD (Rho) versetzt. Unmittelbar darauf erfolgte die Auftragung des 500µg entsprechenden Lysatvolumens, welches mit den anderen Präzipitationkomponenten durch Vortexen gut durchmischt wurde. Die Bindung der Komponenten erforderte dann eine Inkubation der Präzipitationsgemische über 1h bei 4°C (Kühlraum) unter leichtem Schwenken auf einem Vertikalschüttler. Die Präzipitationsprodukte (die GTP gebundenen GTPasen) konnten dann nach mehreren Zentrifugations- (7200g, 30s, 4°C) und Waschschritten (4fach mit je 400µl Lyse-/Bindungs-/Waschpuffer) durch das Erhitzen (95°C, Thermoblock) des Swellgels mit 50µl Probenpuffer (SDS-Bromphenolblauprobenpuffer, 2,5µl Mercaptoethanol) gewonnen und in der SDS Page eingesetzt werden.

#### 2.2.4.4 SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Für die Gelelektrophorese wurden 25µl des denaturierten Präzipitats nach dem Pulldown-Assay (Rac1•GTP, Cdc42•GTP, Rho•GTP) bzw. Proteinlysatsvolumina entsprechend einer Proteinmenge von jeweils 20µg (IκBα, Lyn, Phospho-FcR, Total-Rac1, Total-Cdc42, Total-Rho) oder 40µg (Syk und Phospho-PI3K) eingesetzt. Die Denaturierung der 1:4 mit Laemlie-Puffer (4x, 70µM Mercaptoethanol) versetzten und mit entsprechendem Lysispuffer aufgefüllten Proteinaliquots erfolgte durch Erhitzen über 5min bei 95°C im Heizblock. Anschließend wurden die Proben für die elektrophoretische Auftrennung auf ein 12%iges Acrylamidgel aufgetragen.

Die Präparation des Gels bestehend aus Stopf-, Trenn- und Sammelgel, deren Zusammensetzung *Tabelle 2.2.4.4.1* zu entnehmen ist, erfolgte im Gießstand der Elektrophorese-Aparatur unter Verwendung von 1,5mm-Spacer und Kämmen für 12 oder 18 Taschen. Für die Gelpräparation wurde zunächst ein Stopfgel (500µl Trenngel / 3µl TEMED) zum Abdichten des unteren Scheibenzwischenraums und nach dessen Erstarren ein Trenngel gegossen und mit H<sub>2</sub>O zur Verhinderung des Austrocknen des Gels überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert (45min, RT) war konnte, nach vollständigem Entfernen des Wassers, das Sammelgel gegossen werden. Dieses wurde zur Bildung der Taschen für den Probenauftrag mit einem Kamm versehen. Nach dem Polymerisieren (15min) konnte der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut werden. Ein direktes Befüllen der Apparatur mit dem Elektrophoreselaufpuffer verhinderte auch hier das Austrocknen des Gels. Danach wurden die Proben sowie der Marker (6µl, 1:1 mit Laemlie-Puffer versetzt; Wide Range bzw. für die GTPasen Low Range Colour-Marker, Bandenverteilung siehe *Tabelle 2.2.4.4.2*) aufgetragen. Durch die Befüllung der äußeren Taschen des Gels mit jeweils 6µl Lämli-Puffer konnte ein gleichmäßiger und gerader Geldurchlauf erzielt werden.

	12% Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	4,9ml	4,1ml
30% Acrylamidmischung	6,0ml	1,0ml
1,5M Tris (pH 8,8)	3,8ml	-
1M Tris (pH 6,8)	-	0,75ml
10% SDS	0,15ml	0,06ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,15ml	0,06ml
TEMED	0,006ml	0,006ml

**Tab. 2.2.4.4.1:** SDS-Gel-Zusammensetzung. Mengenangaben für 2 Gele.

Protein	Natives Molekulargewicht [kD]	Farbe	Wide Range	Low Range
Myosin, Muskel, Kaninchen	205	Blau	X	
$\beta$ -Galactosidase, <i>E. coli</i>	116	Türkis	X	
Albumin, Serum, Rind	66	Pink	X	
Ovalbumin, Ei, Huhn	45	Gelb	X	X
Cabonylanhydrase, Erythrozyten, Rind	29	Orange	X	X
Trypsininhibitor, Soja	20	Grün	X	X
A-Lactalbumin, Milch, Rind	14,2	Rot	X	X
Aprotinin, Milch, Rind	6,5	Blau	X	X

**Tab. 2.2.4.4.2:** Bandenverteilung der wide und low range Proteinmarker.

Danach erfolgte die diskontinuierliche Gelelektrophorese zunächst bei einer konstanten Spannung von 100 Volt. Nachdem die Laufmittelfront der Proben die Grenze zum Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht. Hatten die Proben das Gel vollständig durchlaufen wurde die Elektrophorese beendet und die entnommenen Gele zur Vorbereitung auf den Western Blot in Transferpuffer (15min, RT) inkubiert.

#### 2.2.4.5 Western Blot Transfer

Nach Äquilibriumierung an den Transferpuffer wurde das Elektrophorese-Gel auf einer ebenfalls vorinkubierten Nitrocellulosemembran fixiert, indem es zwischen 2 Lagen Filterpapier und 2 Schwämmen in das Sandwich der Western Blot Apparatur eingebaut wurde. Der Transfer erfolgte dann in dem mit Transferpuffer vollständig gefüllten Tank der Apparatur unter Kühlung über 1h bei einer konstanten Spannung von 100 Volt. Dabei wurden die Proteine der GTPasen-Auftrennung auf eine 0,2mm Nitrocellulosemembran alle anderen Proteinauftrennungen auf eine 0,45mm Nitrocellulosemembran transferiert.

#### 2.2.4.5 Aufarbeitung und Detektion der Western Blots

Die Überprüfung des Proteintransfers erfolgte über eine Ponceausfärbung. Dazu wurde die der Apparatur entnommenen Membran in Ponceaus-Rotlösung überführt und das Proteinbandenmuster durch die Entfärbung mit TBS visualisiert. Mit dem Erscheinen eines gleichmäßigen Bandenmusters konnte dann ein erfolgreich durchgeführter Transfer bestätigt werden. Nach vollständiger Entfärbung mit TBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen je nach Antikörper mit einer 5% Magermilch-, 3%- oder 5% BSA-Lösung oder einer Lösung aus 1% Magermilch und 1% BSA in TBST durch eine 1-2h Inkubation bei RT (Tab. 2.2.4.5.1). Danach wurde die Membran 3mal 5min mit TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C auf dem Vertikalschüttler mit der entsprechenden verdünnten Primäntikörperlösung (Tab. 2.2.4.5.1) in Folie eingeschweißt inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der überschüssige Primäntikörper durch 5maliges Waschen der Membranen über 5min mit TBST entfernt. Entsprechend der Herkunft des Erstantikörpers erfolgte eine 1h Inkubation bei RT mit dem Horse Radish Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (anti-Maus/Kaninchen-HRP IgG). Dabei wurde der

Sekundärantikörper in einer 5% Magermilchlösung 1:5000 verdünnt. Nachdem der Antikörperüberschuß in 3 anschließenden Waschschrritten (5min, TBST) entfernt worden war, konnten die Proteinbanden der Membranen durch Chemilumineszenz detektiert werden. Die Chemilumineszenz-Detektion erfolgte am Fluor-S-Max (BD) mit dem ECL Plus Western Blot Detektionsreagenz. Dazu wurden die Membranen in einer 40: 1 Mischung aus Lösung A (Acridiniumester) und B (Peroxid) eingelegt und darin 5min inkubiert. Der Acridiniumester wird dabei enzymatisch durch die über den Zweitantikörper am Zielprotein gebundene HRP-Aktivität in Gegenwart von Peroxiden umgesetzt, wodurch ein elektronisch angeregtes Produkt entsteht, welches bei der Relaxation Licht einer Wellenlänge von 430nm emittiert. Diese Emission kann im Fluor-S-Max detektiert werden. Die Emission der Membranen wurde mit der Software Quantity One (Fluor-S-Max, Blotting, Chemilumineszenz, Ultra Sensitiv) bei -35°C mit einem 50mm Objektiv (Blende 1,4) bei Expositionszeiten von 60-600s je nach Versuchansatz (Tab. 2.2.4.5.2) erfasst.

Antikörper:	Blockierlösung	Blockierzeit	Antikörperverdünnung	Antikörperinkubationslösung	Spezies
Rac1, Pierce	3% BSA	1h	1:1000	3% BSA / 1% NaN <sub>3</sub>	Maus
Cdc42, BD	3% BSA	1h	1:250	3% BSA / 1% NaN <sub>3</sub>	Maus
Rho, BD	3% BSA	2h	1:250	3% BSA / 1% NaN <sub>3</sub>	Maus
Phospho-Lyn (Tyr507), NEB	5% Magermilch	1h	1:1000	5% Magermilch	Kaninchen
Lyn, NEB	5% Magermilch	1h	1:1000	5% Magermilch	Kaninchen
Phospho-Syk (Tyr323), NEB	5% BSA	1h	1:1000	5% BSA	Kaninchen
Phospho-Syk (Tyr525/526), NEB	5% BSA	1h	1:1000	5% BSA	Kaninchen
Phospho-Zap(Tyr319)/Syk (Tyr352), NEB	5% BSA	1h	1:1000	5% BSA	Kaninchen
Syk, NEB	5% BSA	1h	1:1000	5% BSA	Kaninchen
p-Pi3-Kinase (Tyr508), Santa Cruz	1% BSA / 1% Magermilch	1h	1:200	1% BSA / 1% Magermilch	Kaninchen
Phospho-CD32 (FcγRIIb, Tyr292), NEB	5% Magermilch	1h	1:1000	5% Magermilch	Kaninchen
IκBα, Santa Cruz	5% Magermilch	1h	1:1000	5% Magermilch	Kaninchen
Tubulin, Sigma	5% Magermilch	1h	1:5000	5% Magermilch	Maus

**Tab. 2.2.4.5.1:** Zusammenfassung der Blockierungslösungen, Blockierzeiten, Antikörperverdünnungen, -lösungen und Spezies der verschiedenen eingesetzten Antikörper.

Detektion von:	Exposition:
Rac1 (aktiviert), Cdc42 (aktiviert), Rho (aktiviert), Phospho-Syk (Tyr323), Phospho-Syk (Tyr525/526), Phospho-Zap(Tyr319)/Syk (Tyr352)	600s
Total-Rac1, Total-Cdc42, Total-Rho, Phospho-Lyn (Tyr507), Lyn, Syk, p-Pi3-Kinase (Tyr508), Phospho-CD32 (FcγRIIb, Tyr292)	300s
IκBα	180s
Tubulin	120s

**Tab. 2.2.4.5.2:** Expositionszeiten der Detektion der Emission der verschiedenen Antikörper.

Nach der Detektion wurden die Membranen entweder bei 4°C gelagert oder in einer Detektion mit einem weiteren Antikörper eingesetzt.

Für die Detektion von  $\beta$ -Tubulin als Ladekontrolle wurden die Membranen 3mal 5min mit TBST gewaschen und dann wie oben beschrieben erneut blockiert, mit Erst- und Zweitantikörpern inkubiert und detektiert. Wurden andere Ladekontrollen eingesetzt, wie im Fall des Phospho-Lyn (Tyr507) Western Blots, bei dem das Zielprotein selbst in der unphosphorylierten Form als Ladekontrolle diente, oder gab es eine Kreuzreaktionen zwischen dem Antikörper des Zielproteins und der Ladekontrolle, wie bei der I $\kappa$ B $\alpha$  Detektion, wurde ein Strippungsschritt eingeschoben. Beim Stripping werden die an der Membran gebundenen Antikörper `abgezogen`. Dies erfolgt durch eine Inkubation der Membran über 30min bei 50°C mit Strippingpuffer. Nach erneutem Waschen (3mal 5min TBST) konnten die Membranen dann wie beschrieben für eine weitere Detektion aufgearbeitet werden.

#### 2.2.4.6 Auswertung und statistische Analyse der Western Blots

Die aus der Fluoreszenzmessung hervorgehenden Detektionen wurden zunächst für die Auswertung mit der Software Quantity One invertiert. Die resultierenden Bandenintensitäten konnten dann mit derselben Software densitometrisch ermittelt werden. Die so bestimmten optischen Dichten der Banden des Zielproteins wurden dann auf die Werte der optischen Dichten der Banden der Ladekontrolle bezogen und auf die jeweiligen Kontrollen normiert:

$$\frac{[\text{OD (Zielprotein)/ OD (Ladekontrolle)]}_{\text{BelastungX}}}{[\text{OD (Zielprotein)/ OD (Ladekontrolle)]}_{\text{Kontrolle}}} = \text{OD}_{\text{normiert}}$$

mit OD (Ladekontrolle)= OD (Tubulin) oder im Fall der Src-Kinase Lyn OD (Total-Lyn)

Daraus ergab sich die  $\text{OD}_{\text{normiert}}$ , die gegen die Partikelbelastung aufgetragen wurde. Die statistische Analyse erfolgt mit der Software SPSS (Version 10) über eine deskriptive Statistik mit dem LSD-Test unter Verwendung der Rohdaten.

## **2.2.5 Mikroskopische und Immunohistochemische Methoden**

### **2.2.5.1 Zytospinpräparation**

Für alle mikroskopischen Verfahren mit Ausnahme der zeitaufgelösten Mikroskopie, mussten Zytospinpräparationen verwendet werden, da nur so die Zellen der Suspensionskultur vollständig untersucht werden konnten. Bei der Zytospinpräparation wurden die aufgereinigten Zellen der Mischkultur auf den Objektträger zentrifugiert. Die Verwendung von Kulturobjektträgern, auf denen die Zellen während der Kultivierung wachsen, war nicht möglich, da dies zum Verlust der nicht adherenten Zellen führen würde. Auch eine Induktion der Adhärenz der Makrophagen durch die Verwendung von Oberflächenbeschichtungen (wie Polyornithin) musste vermieden werden, da die Adhärenz bei Makrophagen einen entscheidenden Einfluss auf die Zellfunktion hat. Die Präparation von Zytospins erfolgte bei primären Zellen unmittelbar nach der Isolation zur Bestimmung der Reinheit, sowie bei NR8383 Zellen als auch bei primären Makrophagen, nach verschiedenen Partikelbelastungen zur Darstellung und Auszählung (DQ12) der Partikelaufnahme, sowie für die Aktin-, Rezeptor-, Rac1- und NFκB-Immunohistochemie.

Die NR8383 Zellen, die zur Präparation von Zytospins eingesetzt werden sollten, wurden wie in 2.2.1.3 beschrieben ausgesät und belastet (15min, 1h, 4h oder 24h). Danach erfolgte die Aufreinigung der Zellen auf Eis, indem sie zunächst mit einem Zellschaber aus den Kulturgefäßen gelöst und 2fach mit je 2ml eiskalten PBS gewaschen wurden. Nach einer abschließenden Zentrifugation (800g, 4°C, 10min) und der Resuspendierung der Zellpellets in 1ml 3% BSA/PBS-Lösung (4°C) konnte dann die Anzahl der isolierten Zellen mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt werden. Für die Zytospinpräparation wurde ein  $1 \times 10^6$  Zellen entsprechendes Zelllösungsvolumen eingesetzt und mit 3% BSA/PBS auf 340µl aufgefüllt. Die Zellen konnten dann mit der Shandon-Zytospinzentrifuge auf die Zytospinträger übertragen werden, indem die Zelllösung in den auf den Objektträger aufgesetzten Tunnel gefüllt und 5min bei 300rpm zentrifugiert wurde. Die daraus erhaltenen Zytospinpräparationen wurden bei RT luftgetrocknet und bei der Immunohistochemie sofort aufgearbeitet oder bis zum weiteren Einsatz bei 4°C gelagert.

### **2.2.5.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung**

Für die May-Grünwald-Giemsa-Färbung wurden die Zellen der Zytospinpräparationen zunächst mit der May-Grünwald-Lösung überschichtet und 3 min bei RT inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde dann durch gründliches Abspülen und einer 3min Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> entfernt. Anschließend wurde mit einer frisch angesetzten Verdünnung (1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) einer Giemsalösung 15min gefärbt. Es folgten ein erneutes gründliches Abspülen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und die Trocknung. Nach der Reinigung der Objektträger mit Ethanol wurden die

Färbungen mit Euklitt (30µl) eingedeckt und zur Untersuchung der Reinheit der isolierten primären Makrophagen bzw. zur mikroskopischen Analyse der Partikelaufnahme eingesetzt. Die Auswertung der Reinheit erfolgte an 200 Zellen der AM bzw. IM Population. Dabei wurde zwischen polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), Lymphozyten, Monozyten und Erythrozyten differenziert. Aus der Menge der ausgezählten Makrophagen in Relation zur Anzahl der gezählten Zellen ( $\Sigma$  (Makrophagen) /  $\Sigma$  (Zellen)  $\times$  100%) ergab sich dann die Reinheit in %.

Mit den Zytospinpräparationen, der mit den verschiedenen Partikeln belasteten Zellen konnte die Partikelaufnahme visualisiert werden. Dazu wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen im Phasen-Kontrast und im Fall der DQ12 Belastung auch unter Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 555nm) mit einer 1000fachen Vergrößerung erstellt. An den Zytospinpräparationen der DQ12 belasteten Zellen erfolgte zusätzlich die Quantifizierung der Partikelaufnahme zur Etablierung der durchflusszytometrischen Methode. Dazu wurden die Phagozytose-positiven Zellen von insgesamt 100 Zellen je Zytospin ausgezählt. Aus der Anzahl der ausgezählten Phagozytose-positiven Makrophagen und der Makrophagengesamtzellzahl ( $\Sigma$  (Phagozytose positive Makrophagen) /  $\Sigma$  (Gesamtzellzahl, 100)  $\times$  100%) konnte dann der prozentuale Anteil der Phagozytose positiven Zellen berechnet werden und statistisch mit der Software SPSS (Version 10) über eine deskriptive Statistik mit dem Turkey-Test analysiert.

### **2.2.5.3 Immunohistochemie**

Die Immunohistochemie wurde ausschließlich an frisch präparierten Zytospins DQ12 belasteter Zellen durchgeführt. Die jeweiligen Präparationsschritte (Fixierung der Zellen auf dem Zytospinträger, Permeabilisierung der Zellen, und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) erfolgten durch Auftragung eines entsprechenden Lösungstropfens auf das Zellfeld der Zytospinpräparationen. Nach der Fixierung (4%PFA/PBS pH 7,4, 10min, RT), der Permeabilisierung (0,1% TritonX-100, 3min, RT) und der Blockierung (1%BSA/PBS, 15min, RT), unterbrochen von Waschsritten (jeweils 4mal mit PBS, 4°C) folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (4°C, über Nacht). Um das Austrocknen der Zellen verhindert, wurde auf jedes Zellfeld der Zytospinpräparationen 20µl der entsprechenden Primärantikörperverdünnung gegeben (Tab. 2.2.5.3.1) und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Inkubation erfolgte dann in einer Feuchtkammer. Nach der Inkubation wurden zunächst die Deckgläschen mit PBS (4°C) abgespült. Die so freigelegten Zellen auf den Objektträgern wurden dann 4fach mit PBS (4°C) gewaschen.

Antikörper:	Antikörper-Verdünnung	Spezies
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488Phalloidin (Stock: 6,6µM)	1:20	-
FcγIIIR, BD	1:10	Maus
CR, BD	1:10	Maus
MR, Serotec	1:10	Maus
Rac1, BD	1:10	Maus
NFκB	1:250	Maus

**Tab. 2.2.5.3.1:** Zusammenfassung der Antikörperverdünnung und Spezies der verschiedenen eingesetzten Antikörper.

Da der für die Aktinfärbung verwendete Alexa Fluor<sup>®</sup>488Phalloidin-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt vorlag, musste keine Sekundärantikörperinkubation erfolgen. Die Präparate konnten direkt, wie unten beschrieben eingedeckt werden. Für alle anderen Färbungen wurde die Inkubation mit der Sekundärantikörperverdünnung (MFP488 Goat Anti-Rabbit IgG, 1:200) technisch genauso, wie zuvor für den Primärantikörper beschrieben durchgeführt. Die Inkubation erfolgte hier allerdings bei RT über 1h in der Feuchtkammer. Eine Fluoreszenzfärbung oder eine Doppelfärbung mit einem durch 555nm angeregten, im roten Wellenlängenbereich fluoreszierenden, Sekundärantikörper war aufgrund der DQ12 Autofluoreszenz nicht möglich. Nach der letzten Inkubation wurden wieder Deckgläschen und Lösungen durch gründliches Spülen mit PBS entfernt. Die Zellfelder mussten nach dem Abtropfen der Objektträger zügig ohne Austrocknung eingedeckt (ca. 30µl, Immuno-Fluore Mounting Medium) werden. Die Verwendung des Mounting Medium hat im Gegensatz zu Euklitt den Vorteil, dass es in der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung die Präparate vor dem Photobleichen schützt. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte unter Nutzung von Phasen-Kontrast und Fluoreszenz bei einer 1000x Vergrößerung mit dem OlympusBX60 Mikroskop.

Im Fall der NFκB-Immunohistochemie wurde des Weiteren eine Kernfärbung zur Visualisierung der Zellkerne durchgeführt. Dafür wurden die Zellen nach der Sekundärantikörperbehandlung 3fach mit PBS gewaschen und anschließend mit 20µl DAPI-Lösung (1µg/ml/PBS) 5min bei 37°C inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschrritten erfolgte das Eindecken wie schon beschrieben.

#### 2.2.5.4 Zeitaufgelöste Mikroskopie

Nach der Wachstumsphase von 3 Tagen wurden die NR8383 Zellen für die zeitaufgelöste Mikroskopie unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung belastet. Dazu wurden 40µl einer 0,32mg/ml Quarzlösung (Belastung von 40µg/cm<sup>2</sup>) in die 96-well-Kulturplatten gegeben. Während der Beobachtung befanden sich die Zellen in einer, dem Mikroskop angeschlossenen Inkubationskammer (37°C CO<sub>2</sub>). Die Aufnahmen der zeitaufgelösten Mikroskopie wurden an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Abteilung für

Dermatologie und Strahlenonkologie von Herrn Erich Bünemann aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 400 x Vergrößerung über 30min mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 6 Bildern/min. Für die zeitaufgelöste Darstellung wurden repräsentative Ausschnitt dieser Aufnahmereihe ausgewählt und mit der Software Adobe Premiere bearbeitet.

#### **2.2.5.5 SWNT Brightfield- und Nahinfrarot-Mikroskopie**

Auch für die an der RICE Universität Houston durchgeführte Mikroskopie im Nahinfrarot Bereich sowie für die Aktinfärbung nach SWNT-Belastung mussten Zytospinpräparationen erstellt werden. Dazu wurden  $1,1 \times 10^5$  NR8383 Zellen/cm<sup>2</sup> in 345µl Medium in 24well-Kulturschalen ausgesät. Nach 3tägigem Wachstum erfolgte die Belastung durch Zugabe von 345µl der 30µg/ml SWNT-Lösung (15µg/ml Belastung) bzw. durch die Zugabe von 86,25µl der 30µg/mL SWNT-Lösung und 258,75µl Medium (3,75µg/ml Belastung). Nach der 1h Belastung wurden die Zytospins wie oben beschrieben präpariert und für die Aktinfärbung eingesetzt oder fixiert (4% PFA, RT, 10min) auf Eis zur Messung verschickt. Für die Präparation der Zytospins für die Nahinfrarot-Spektroskopie mussten allerdings Quarzobjektträger verwendet werden, da diese im Gegensatz zu Glasobjektträgern im nahinfraroten Wellenlängenbereich keine Autofluoreszenz zeigen und somit nicht mit der Messung interferieren.

Bei der Nahinfrarot-Spektroskopie/Mikroskopie zur Bestimmung der Aufnahme von SWNT's durch die NR8383 handelt es sich wieder um eine Einzelzellbetrachtung die von Tonya Leeuw an der RICE Universität in Houston, USA durchgeführt wurde. Zur Quantifizierung der Aufnahme wurden Brightfield- und Nahinfrarot-Aufnahmen von je 25 Zellen der Kontrolle, der 3,75µg/ml sowie der 15µg/ml SWNT-belasteten Zellen analysiert. Die Aufnahme im Brightfield ermöglichte die Bestimmung der Zellausmessungen. Aus den Einzelzellfluoreszenzaufnahmen, die nach der Anregung durch einen Laser mit 660nm in einem Wellenlängenbereich von 1125-1600nm aufgenommen wurden, konnten dann aus den daraus gewonnenen Nahinfrarot-Spektren die Fluoreszenzintensitäten ermittelt werden (Cherukuri et al. 2004). Für die Auswertung wurden die Einzelfluoreszenzintensitäten gemittelt und gegen die SWNT-Belastungskonzentration aufgetragen.

## 2.2.6 Messung der ROS Generierung

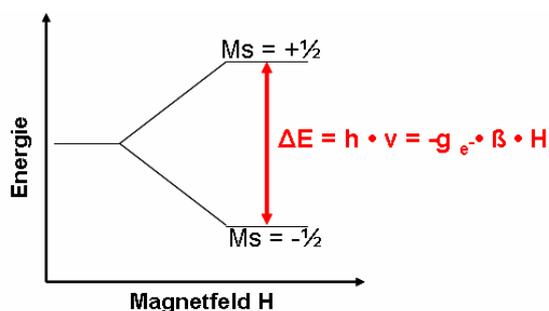
Zur Messung der ROS-Generierung wurden drei unterschiedliche Methoden, welche die Analyse der Radikalbildung in verschiedenen Kompartimenten ermöglichte, eingesetzt. Die ESR-Spektroskopie mit DMPO als Spintrap (Radikalfalle) wurde dazu genutzt, die durch Makrophagen freigesetzten oder von der Partikeloberfläche im Puffer generierten Radikale, extrazellulär zu bestimmen. Mit der durchflusszytometrischen Methode dagegen konnte durch die Einzelzellbetrachtung die intrazellulär gebildete Menge ROS über die Oxidation von DHR123 zu Rhodamin analysiert werden. Zusätzlich bot die Durchflusszytometrie in einer Mehrparameterstudie die Möglichkeit zur simultanen Untersuchung von Partikelaufnahme und ROS Generierung. Mit Hilfe des Lucigenin-Assay wurde durch die Messung der Chemilumineszenz die Gesamt-ROS-Generation (intra- und extrazellulär) gemessen. Alle Messungen erfolgten dabei in HBSS<sup>(+/+)</sup> um einen Sensitivitätsverlust des Assays durch die Radikal absorbierenden Eigenschaften des Mediums zu vermeiden.

### 2.2.6.1 Messung der extrazellulären ROS-Bildung durch ESR-Spektroskopie

#### 2.2.6.1.1 Messtechnik

Die Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) Spektroskopie wird zur Untersuchung von paramagnetischen Substanzen (Moleküle mit ungepaarten Magnetspin) eingesetzt und daher auch als Elektron-Paramagnetische-Resonanz (EPR) Spektroskopie bezeichnet. Bei der ESR-Spektroskopie wird die Absorption von Mikrowellenstrahlung durch ungepaarte Elektronen im magnetischen Feld ausgenutzt.

Elektronen besitzen, durch ihren Spin (Eigendrehimpuls) ein magnetisches Moment ( $\mu_{e^-} = -g_{e^-} \cdot \beta \cdot S$ , mit  $g_{e^-}$  = Landéscher g-Faktor,  $\beta$  = Bohrsches Magneton =  $e \cdot \hbar / 2m_e$  [ $\hbar$ =Plancksche Konstante,  $m$ =Masse und  $e$ =Ladung des Elektrons],  $S$  = Eigendrehimpuls (Spin) des Elektrons). Wird das Elektron in ein äußeres Magnetfeld  $H$  gebracht, tritt es mit diesem in Wechselwirkung und hat dann die potentielle Energie  $E_{pot} = -\mu_{e^-} \cdot H$ . Das Elektron kann sich dabei nur parallel ( $M_s = -1/2$ ) oder antiparallel zum Magnetfeld ( $M_s = +1/2$ ) ausrichten



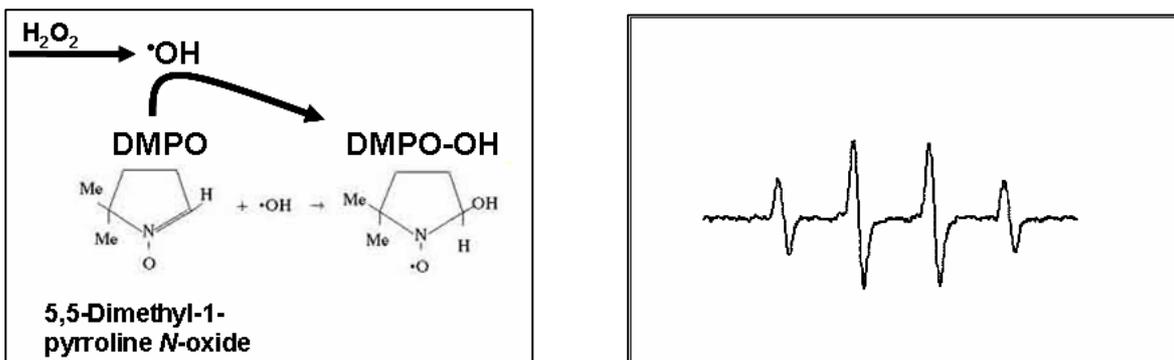
**Abb. 2.2.6.1.1.1:** Elektronenspinneiveaus im Magnetfeld aus Walte Hoppe 185).

(Zeeman-Aufspaltung) und somit in zwei Energieniveaus existieren (Abb. 2.2.6.1.1.1). Der Übergang zwischen den beiden Energieniveaus kann durch elektromagnetische Wellen mit  $E = \Delta E = h \cdot \nu = -g_{e^-} \cdot \beta \cdot H$  induziert werden. Diese Absorption und Emission wird im ESR-Spektrometer gemessen (Walter Hoppe S.185). Da jedoch nicht nur ein freies

Elektron betrachtet wird treten weitere Wechselwirkungen auf. Es kommt zur Aufspaltung

des ESR-Spektrums. Bei einem atomgebundenen ungepaarten Elektron tritt eine weitere magnetische Wechselwirkung mit dem vom inneren Kernspin generierten Magnetfeld auf. Es kommt durch die Wechselwirkung mit dem benachbarten Kern zur Hyperfeinaufspaltung (Walter Hoppe S.185). Diese Aufspaltung in 4 Signale ist im Spektrum des DMPO-Methylradikals zu beobachten (Abb. 2.2.6.1.1.2).

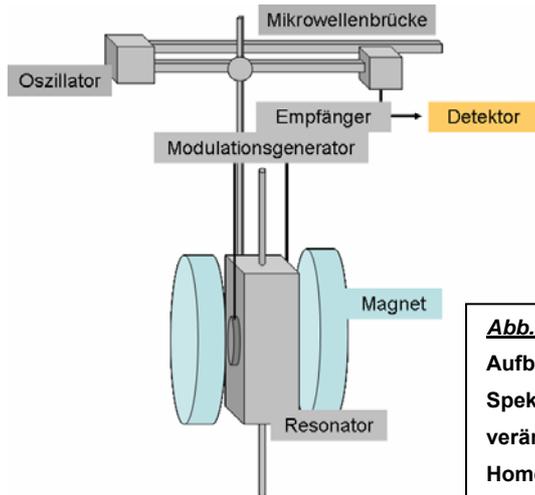
Zur Messung der DQ12 induzierten ROS-Generierung wurde die Spin-Trap-Technik eingesetzt. Dabei werden die DQ12 induzierten kurzlebigen Radikale mit einer Spintrap in eine stabilere Radikalform umgesetzt. Als Radikalfänger wurde hier das als nichtmembranpermeable geltende DMPO genutzt, welches mit den gebildeten kurzlebigen Radikalen im Zellüberstand zu einem sekundären, langlebigen DMPO-Methylprodukt reagiert. Die Menge des gebildeten Adduktes ist proportional zur Intensität der aufgezeichneten ESR-Signale, sodass aus den gemessenen ESR-Spektren, anhand der Auswertung der Intensität der 4 ESR-Signale die ROS-Generierung quantifiziert werden konnte (Abb. 2.2.6.1.1.2).



**Abb. 2.2.6.1.1.2:** Umsetzung des Radikalfängers DMPO mit Hydroxylradikalen zum Methylradikalprodukt (links). ESR-Spektrum des DMPO-Hydroxylprodukts aufgenommen mit dem MiniScopeMS100 ESR-Spektrometer (60s, 6,9mT, 9,4 GHz, Feld 338mT, übernommen und verändert von der Magentech-Homepage).

Ein ESR-Spektrometer besteht im wesentlichen aus 3 Bauteilen, einem Mikrowellengenerator, zur Erzeugung der nötigen Anregungsenergie (Mikrowellenstrahlung), dem Magnetfeldgenerator der das Magnetfeld erzeugt und einem Detektorsystem welches die Absorption/Emission aufnimmt.

Beim verwendeten MiniScope ESR-Spektrometer wird das zur Aufspaltung nötige äußere Magnetfeld durch einen Elektromagneten erzeugt. Die Energie (Mikrowellenstrahlung) für den elektronischen Übergang des Elektrons wird mit einem Gunn Oszillator generiert und über eine Mikrowellenbrücke zum Probenraum geleitet. Die Energieabsorption wird durch einen Empfänger der Mikrowellenbrücke aufgenommen und detektiert.



**Abb. 2.2.6.1.1.4:** Schematischer Aufbau des MiniScopeMS100 ESR-Spektrometers (übernommen und verändert von der Magentech-Homepage).

### 2.2.6.1.2 Praktische Durchführung

Von dem, bei der ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der extrazellulären ROS-Generierung, verwendete Radikalfänger (DMPO) musste zunächst eine Lösung aufgereinigt werden. Durch die Verwendung steriler Reaktionsgefäße oder mit HCl und Wasser in AAS-Qualität gespülter Glasware bei der Herstellung der DMPO-Lösung wurde sichergestellt, dass keine Metallverunreinigungen auftraten. Die gelieferte, aufgetaute DMPO-Lösung (1g) wurde zunächst in 1ml Wasser (AAS-Qualität) aufgenommen, in ein steriles Falconreaktionsgefäß überführt und mit Wasser auf 7,5ml aufgefüllt. Nach dem Zufügen von 225mg (30mg/mL) Aktivkohle folgte eine Inkubation bei 35°C über 20min unter kontinuierlichen Schwenken. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (2250g, 10min, RT) und der so gewonnene Überstand in ein neues Falconreaktionsgefäß überführt. Es folgte, nach erneuter Zugabe einer dem DMPO-Lösungsvolumen proportionalen Menge Aktivkohle (30mg/ml), eine weitere Inkubation und Zentrifugation wie zuvor beschrieben. Abschließend wurde der resultierende Überstand durch Filtrierung (0,20µm Filteraufsatz) gereinigt. Die Bestimmung der DMPO-Konzentration erfolgte dann durch die Messung der Absorption der 1:10.000 verdünnten DMPO-Lösung bei 234nm über die Formel:  $c(\text{DMPO}) = (\text{Absorption bei } 234\text{nm}) / E(\text{DMPO}) \times 10.000$ , mit  $c$  = Konzentration,  $E$  = DMPO-Extinktionskoeffizient =  $77001\text{mol}^{-1}$ . Durch die Zugabe von Wasser (AAS Qualität) wurde eine 1M DMPO-Lösung hergestellt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Messung erfolgte zunächst an den in Medium herangezogenen NR8383 Zellen (Kapitel 2.2.1.3) der Austausch des Kulturmediums mit HBSS ( $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ,  $+/+$ ) indem die nicht adherente Zellfraktion im Medium abgenommen und zur Zentrifugation in Falcoreaktionsgefäße überführt wurde. Der in der Kulturschale verbliebene Zellrasen wurde dann mit je 1ml auf 37°C vorgewärmtem HBSS( $+/+$ ) gewaschen und um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern mit 400µl HBSS( $+/+$ ) überschichtet. Nach Zufügen der Waschlösung wurde die Zellsuspension bei 900g zentrifugiert. Das erhaltenen Zellpellets aus nicht

adherenten Zellen wurde in 290µl HBSS<sup>(+/+)</sup> resuspendiert und wieder mit der adherenten Fraktion in den Kulturschalen vereint. Die Regenerierung vom Stress des Waschprozesses erfolgte durch die Inkubation der Zellen über 30min (37°C unter 5% CO<sub>2</sub>).

Für die Untersuchung der Rolle des Aktinzytoskeletts in der ROS-Generierung erfolgte eine anschließende Aktininhibition (siehe Kapitel 2.2.1.4). Für die Quarzbelastung wurden direkt oder nach der Zytoskelettinhibition die frisch präparierte Partikellösung (5mg/ml) in HBSS<sup>(+/+)</sup> bzw. der FcR-Antikörper (1:200) unter simultaner Zufügung von DMPO (0,11M) zugesetzt. Dabei wurden die verschiedenen Proben mit einer Zeitverschiebung von 5min belastet, um später die nötige Messzeit zu gewährleisten.

Die Bestimmung der Radikalgenerierung erfolgte nach 1h bzw. 3h Partikelbelastung (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) an 50µl im 5min Takt abgenommenen Zellüberstand bei RT mittels ESR-Spektroskopie. Dabei wurde das in der folgenden Tabelle (Tab. 2.2.6.1.2.1) zusammengefasste Instrumenten-Setup verwendet.

<b>Mikrowellenfrequenz:</b>	<b>9,39 GHz</b>
<b>Magnetische Feldstärke:</b>	<b>3360G</b>
<b>Sweep Bereichsbreite</b>	<b>100G</b>
<b>Scanzeit</b>	<b>30s</b>
<b>Anzahl der Scans</b>	<b>3</b>
<b>Modulationsamplitude</b>	<b>1,8G</b>
<b>Receiver gain</b>	<b>1000</b>

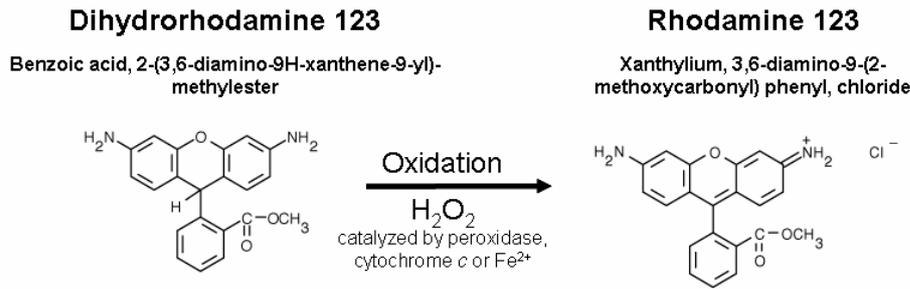
**Tab. 2.2.6.1.2.1:** Einstellungen des ESR-Spektrometers zur Messung der ROS-Generierung.

Die der Radikalbildung proportionale Erhöhung der Signalintensitäten konnte durch die Analyse der erhaltenen Spektren mittels der Instrumentensoftware bestimmt werden. Aus den gemessenen Einzelintensitäten der 4 DMPO-Signale bei magnetischen Feldstärken von  $1,5 \times 10^7$ ,  $2,1 \times 10^7$ ,  $2,65 \times 10^7$  und  $3,25 \times 10^7$  Gauß wurde dann die mittlere ESR-Signal-Intensität berechnet. Abschließend wurden die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten berechnet und gegen die Partikelbelastung aufgetragen werden. Die statistische Analyse erfolgt mit Hilfe der Software SPSS (Version 10) über eine deskriptive Statistik mit dem LSD-Test unter Verwendung der mittleren ESR-Signal-Intensität.

**2.2.6.2 Durchflusszytometrische Messung der intrazellularen ROS Generierung**

**2.2.6.2.1 Messtechnik**

Die in 2.2.3.1 beschriebene durchflusszytometrische Methode wurde nun zur Bestimmung der ROS-Generierung unter Verwendung von Dihydrorhodamin 123 (DHR123) eingesetzt. Dabei wird das passiv in die Zelle diffundierende, nicht fluoreszierende DHR123 in das bei 530nm emittierende Rhodamin umgesetzt (Abb. 2.2.6.2.1.1). Diese Umsetzung erfolgt hauptsächlich durch das gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die sich durch das gebildete Rhodamin entwickelnde Fluoreszenz ist somit proportional zur ROS-Generierung und kann durch die durchflusszytometrische Messung des FL1Heights (Fluoreszenzmessung bei 530nm) quantifiziert werden.



**Abb. 2.2.6.2.1.1:** Oxidative Umsetzung des Dihydrorhodamins 123 (DHR123) zum fluoreszierenden Rhodamin 123. Erstellt nach Molekular Probes Produktkatalog.

Die Radikalbildung wurde durch die Messung des FL1Heights, parallel zur Messung des Vowärts(FSC)- und Seitwärts(SSC)-Streulichts verfolgt. Die Durchflusszytometrie bietet also die Möglichkeit, simultan zur Partikelaufnahme die ROS Bildung zu messen (Imrich und Kobzik 1997, Imrich et al. 1999).

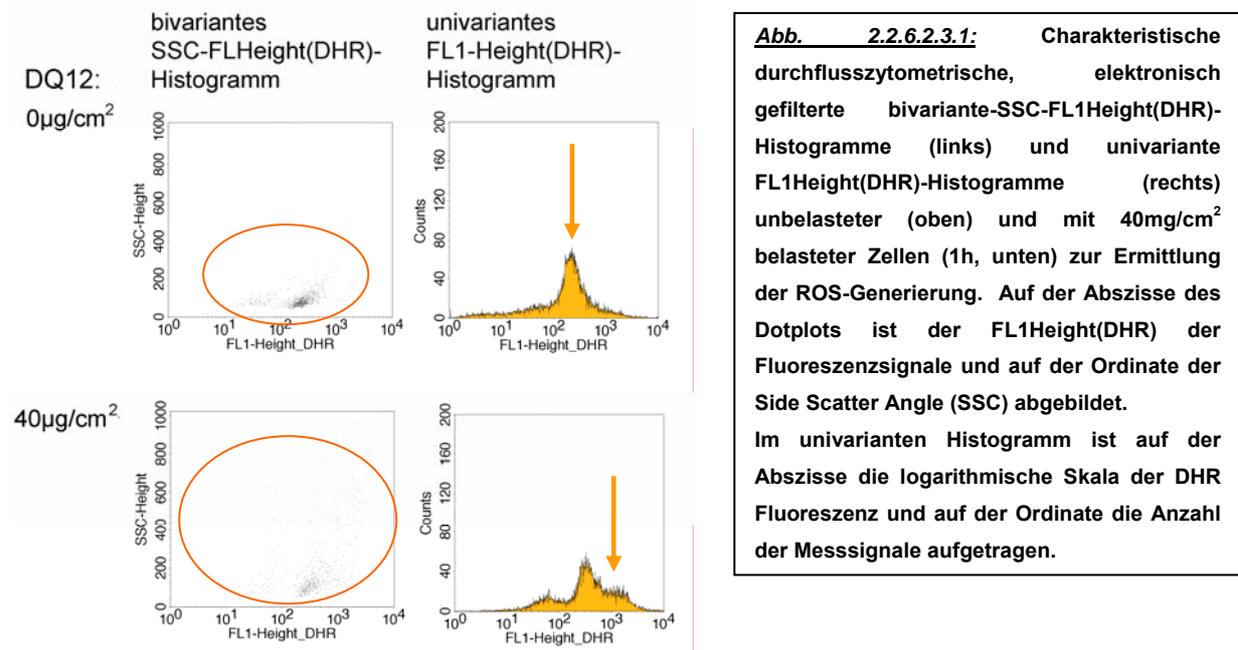
### 2.2.6.2.2 Praktische Durchführung

Für die simultane Messung der ROS-Generierung und der Partikelaufnahme wurde den Zellen zunächst das Medium entzogen und durch HBSS<sup>(+/+)</sup> ersetzt (Kapitel 2.2.6.1.2). Nach der Regenerierung (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 30min) erfolgte zunächst eine 30min Vorinkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) mit DHR123 (4µM). Darauf folgte dann die Aktininhibition (siehe Kapitel 2.2.1.4), die direkte Quarzbelastung (1h, 10 µg/cm<sup>2</sup>, 40µg/cm<sup>2</sup>) oder die Zugabe des FcR-Antikörper (1h, 1:200). Danach wurden die Zellen auf Eis mittels eines Zellschaber aus den Kulturschalen gelöst, mit HBSS<sup>(/-)</sup> (1ml, 4°C) gewaschen und bis zur durchflusszytometrischen Messung in 400µl HBSS<sup>(/-)</sup> resuspendiert auf Eis gelagert. Die Messung des FL1-Height(DHR), der Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei 530nm, sowie des SSC und FSC erfolgte unter den in *Tabelle 2.2.3.1.1* zusammengefassten Detektorparametern an 10.000 Zellen.

### 2.2.6.2.3 Datenanalyse

Die Datenerfassung und Analyse erfolgte mit der Software BD Cell Quest 3.3. Dabei wurde die DQ12-Aufnahme wie in 2.2.3.3 beschrieben an den bivarianten SSC-FSC-Histogrammen und univarianten SSC-Histogrammen über die Verschiebung des Median SSC bestimmt. Die DQ12 induzierte ROS Generierung wurde durch die Analyse der elektronisch auf Zellen gefilterten bivarianten SSC-FL1-Height(DHR)-Histogrammen (gated) und univarianten FL1-Height(DHR)-Histogrammen über die Verschiebung des Median FL1Heights ermittelt. Dabei entspricht der Median FL1Heights der Fluoreszenzintensitätsverteilung innerhalb der Zellpopulation. Dazu wurde das Gate aus den bivarianten SSC-FSC-Histogrammen auf die Auftragung der gemessenen FL1-Height(DHR)-Daten angewendet und in den bivarianten SSC-FL1-Height(DHR) und univarianten FL1-Height(DHR)-Histogrammen umgesetzt. Die so

erstellten bi- und univariante Histogramme (gated) der gemessenen Fluoreszenz (FL1-Height(DHR)) sind in *Abb. 2.2.6.2.3.1* exemplarisch für eine Kontrolle (oben) und für eine  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Belastung mit DQ12 (unten) abgebildet.



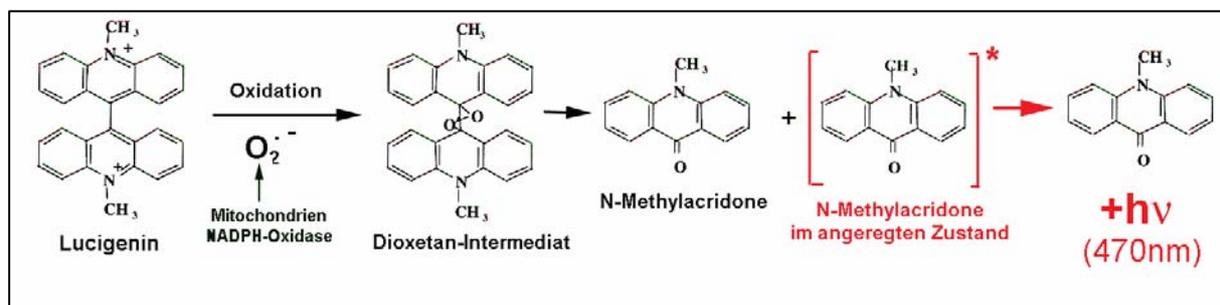
In den Dotplots sind auf der Abszisse logarithmisch die Signale der Fluoreszenz (FL1-Height(DHR)) in Kanälen mit Dekaden von 0-10.000 abgebildet. Die Ordinate zeigt das SSC-Signal. Durch die Belastung ändert sich die Granuläritäts- und Fluoreszenzsignalverteilung der Zellen. In den bivalenten SSC-FL1Height(DHR)-Histogramme der Kontrolle und der  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Belastung ist die Partikelaufnahme sowie die ROS-Generierung an der Verbreiterung und Ausdünnung der Zellwolke zu beobachten. Die univariante FL1-Height(DHR) Histogramme (gated) zeigen auf der Abszisse die Kanäle der gemessenen Fluoreszenz (FL1-Height(DHR)) in logarithmisch mit Dekaden von 0-10.000 und auf der Ordinate die Anzahl der gemessenen Signale (Zellen). Infolge der DQ12-Belastung erhöht sich die Fluoreszenzsignalverteilung. Aus diesen Histogrammen wurde der Median FL1-Height(DHR), als Maß für die Ros-Generierung, für die verschiedenen Partikelbelastungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Ansätzen bestimmt.

Die berechneten Mittelwerte konnten dann gegen die verschiedenen Belastungen aufgetragen und statistisch mit der Software SPSS (Version 10) über eine Varianzanalyse (95% Konfidenzintervall, mit der Größe (FSC) als Kovariante) ausgewertet werden.

### 2.2.6.3 Messung der ROS Generierung durch den Lucigenin-Assay

#### 2.2.6.3.1 Messtechnik

Der Lucigenin-Assay basiert auf der Messung der Chemilumineszenz. Chemilumineszenz ist die Emission elektromagnetischer Wellen (meist im visuellen oder nah-infraroten Bereich) die bei einer chemischen Reaktion frei wird. Dabei wird ein Substrat durch die Reaktion mit Oxidantien unter möglicher Einwirkung von Cofaktoren oder Katalysatoren in ein elektronisch angeregtes Produkt umgewandelt. Dieses fällt unter Emission von Photonen in den Grundzustand zurück. Die Intensität dieser als Chemilumineszenz bezeichneten Emission ist dabei unter anderem proportional zur Konzentration des gebildeten, angeregten Moleküls und ist somit ein Maß für die Umsatzrate der Reaktion (Garcia-Campana et al 2001). Im Lucigenin-Assay ist Lucigenin das Substrat, welches hauptsächlich mit Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) zu einem Dioxetanintermediat reagiert, das im weiteren Reaktionsverlauf zu N-methylacridon zerfällt (Abb. 2.2.6.3.1.1). Bei der Relaxation des entstehenden, angeregten N-methylacridon wird Licht der Wellenlänge von 470nm im blauen Wellenlängenbereich emittiert. Die Emissionsintensität ist dabei der Umsatzrate der Reaktion proportional, welche in direkter Abhängigkeit zu dem von den Makrophagen in Mitochondrien oder durch die NADPH-Oxidase gebildeten  $O_2^{\cdot-}$  steht. Sie ist also ein direktes Maß für die ROS-Generierung (Dyke et al 2003).



**Abb. 2.2.6.3.1.1:** Chemilumineszenzreaktion des Lucigenins zum Luminol (nach Dyke et al. 2003 und Garcia-Campana et al. 2001).

Die freigesetzte Strahlung wird im Luminometer gemessen (Abb. 2.2.6.3.1.2). Dieses besteht aus einem Probenraum mit Probenhalter, einer Reaktionszelle, dem Detektor und einem Signal-Prozessorsystem, welches die Aufnahme, Darstellung und Analyse der Messdaten ermöglicht. Der beheizbare Probenhalter schottet das Reaktionsgemisch in der Reaktionszelle von externem Licht ab und bietet zudem die Möglichkeit, diese auf eine optimale Reaktionstemperatur (hier 37°C) zu beheizen. Die Reaktionskammer, Lumi-Nunc-Platten im 96well Format aus weißem Polyesterol, vermindert zusätzlich von außen einfallendes Licht und zeigen zudem nur eine geringe Autofluoreszenz und -lumineszenz bei maximaler Reflektion. Ihre direkte Platzierung vor dem Detektor verhindert die Interferenzen mit externem Licht und erhöht die Messeffizienz. Der Detektor ist in der Lage die

Lichtintensität über einen weiten Magnitudenbereich und über eine längere Zeitspanne zu erfassen. Die Chemilumineszenzreaktion wird durch das Mischen der Reaktionskomponenten gestartet. Die dabei entstehende Emission kann danach in einem kurzen Lichtblitz oder kontinuierlich über eine längere Zeitspanne abgegeben werden. Daher erfordert jede Anwendung eine Optimierung der Messzeit auf das untersuchte System. Für den hier eingesetzten Lucigenin-Assay ergab sich aus Vorversuchen zur Messung der DQ12-induzierten ROS-Generierung in NR8383 Zellen eine optimale Messzeit von 1h. Danach ist keine Lichtemission über dem Rauschniveau mehr zu verfolgen (Abb. 3.4.1.1.3).

### **2.2.6.3.2 Praktische Durchführung**

Der Lucigenin-Assay zur Bestimmung der ROS-Generierung wurde im 96-well-Ansatz durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach 3tägigem Wachstum mit einem Zellschaber aus den Kulturgefäßen gelöst und 2fach mit je 1ml auf 37°C vorgewärmten HBSS<sup>(+/+)</sup> gewaschen. Abschließend erfolgte nach der Resuspendierung der Zellen in 690µm HBSS<sup>(+/+)</sup> die erneute Zellaussaat, indem je 100µl der Zelllösung für die folgende Lumineszenzmessung auf 96 well LumiNunc Platten in je 8 Ansätzen pro Belastung aufgetragen wurden. Die Zellen, sowie alle benötigten Lösungen (dunkel gelagerte Lucigenin-Lösung ( $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ), Partikellösungen) wurden bis zur Messung bei einer Temperatur von 37°C gehalten. Die Zugabe von 40µl des HBSS<sup>(+/+)</sup>, Kontrolle) bzw. der jeweiligen Partikellösungen sowie 10µL der Lucigenin-Lösung erfolgte unmittelbar vor der Lumineszenzmessung am Luminometer. Während der Lumineszenzaufnahme wurden über 1h Daten von 22 Lumineszenzmessungen in Abständen von 3min bei 37°C erfasst aus denen die induzierte ROS Generation für die verschiedenen DQ12-Dosen, vereinfacht als der Mittelwert der zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Lumineszenzen, berechnet wurde.

### **2.2.6.3.3 Datenanalyse**

Die Datenerfassung der Chemilumineszenzmessung erfolgte mit der Software winpez/winglow. Die Gesamtlumineszenz, die dem Reaktionsumsatz proportional ist, ergibt sich aus der Auftragung der zu einem Messzeitpunkt aufgenommenen Chemilumineszenzen als die Fläche unter der Kurve. Dies lässt sich vereinfachen zur Summe, der zu den verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommenen Fluoreszenzen ( $\text{Fluoreszenz}_{t=x}$ ), dividiert durch die Anzahl der Zeitpunkte der Messungen ( $n_t$ ),  $\text{Gesamtchemilumineszenz} = \text{Lumineszenzintensität} = \sum \text{Fluoreszenz}_{t=x} / n_t$ . Die sich daraus ergebende Lumineszenzintensität ist der gebildeten ROS-Menge proportional. Diese wurde auf die Kontrolle ( $\equiv 100\%$ ) normiert und als % der Kontrolle gegen die Partikelbelastung aufgetragen. Die statistische Analyse erfolgt mit der Software SPSS (Version 10) über eine deskriptive Statistik mit dem LSD-Test unter Verwendung der Rohdaten.

### 2.2.7 TNF- $\alpha$ -ELISA

Der TNF- $\alpha$  ELISA-Assay erfolgte an Zellüberständen nach Belastungen über 4, 8 und 24h unter oder ohne Inhibition (wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben), unter Verwendung des TNF- $\alpha$  Kit's von R&D Systems. Der Sandwich Enzym-Immuno-Assay beruht auf Bindung des TNF- $\alpha$  des Überstands an den auf der Mikrotiterplatte fixierten spezifischen Antikörpern. Des Weiteren erfolgt eine Kopplung mit einem Horseradish Peroxidase gebundenen TNF- $\alpha$ -Antikörper, der über die enzymatische Umsetzung mit Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidine zu einem blauen Produkt führt. Dieses verfärbt sich durch den Zusatz von Salzsäure gelb. Aus der bei 540nm gemessenen Färbungsintensität lässt sich dann über eine Standardreihe die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand bestimmen. Dazu wurden zunächst die Zellen nach der Belastung auf Eis von den Kulturschalen gelöst und die Überstände von der gewonnenen Zellsuspension durch Zentrifugation (800g, 4°C, 10min) abgetrennt. Die isolierten Überstände wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Ausführung des Assays musste dann zunächst die dem Kit beigefügte Kontrolle mit 1ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> rekonstituiert und das TNF- $\alpha$ -Konjugat (0,5ml/11ml Konjugatverdünnungsmittel / Platte) sowie der Waschpuffer (25ml Waschpufferkonzentrat / 625ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> / Platte) verdünnt werden. Das Ansetzen der Standardreihe erfolgte nach Lösen (5min RT, leichtes Schütteln) des beigefügten TNF- $\alpha$ -Standard in 2ml Kalibrierungslösung, RD5-17, woraus sich eine Stocklösung mit einer Konzentration von 800pg/ml ergibt. Von der Stocklösung wurde dann eine Verdünnungsreihe (1:1, Stocklösung : Kalibrationslösung, RD5-17) mit 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 pg/ml angesetzt. Das Mischen der Substratlösungen (1:1 Lösung A, Wasserstoffperoxid : Lösung B, Tetramethylbenzidin) erfolgte 15min vor ihrer Benutzung. Im Assay selbst wurden dann unverdünnte Überständen eingesetzt, denen zunächst je 50 $\mu$ l des Lösungsmittels RD1-41 in die wells der 96well Mikrotiterplatte pipetiert wurden. Danach erfolgte die Auftragung von je 50 $\mu$ l der Standards, Kontrolle (TNF- $\alpha$ -Lösung) und Überständen und eine Inkubation der abgedeckten Platte über 2h bei RT. Danach wurden die Reaktionslösungen durch 5maliges Waschen (400 $\mu$ l) entfernt und mit 100 $\mu$ l des TNF- $\alpha$ -Konjugats aufgefüllt. Nach einer weiteren Inkubation bei RT über 2h wurde erneut wie beschrieben gewaschen und 100 $\mu$ l der frisch angesetzte Substratlösung zugesetzt. Die enzymatische Umsetzung erfolgte in einer 30min Inkubation bei RT unter Lichtausschluss. Nach Zugabe der Stopplösung konnte die optische Dicht bei 450nm im ELISA-Reader gemessen werden. Die Berechnung der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand erfolgte dann aus den gemessenen optischen Dichten über die Standardkurve. Die berechneten Absolutwerte wurden auf die Kontrollen normiert und als TNF- $\alpha$ -Freisetzung gegen die Partikelkonzentration aufgetragen. Die statistische Analyse erfolgt mit der Software SPSS (Version 10) über eine deskriptive Statistik mit dem Turkey-Test unter Verwendung der Rohdaten.

---

## Kapitel: 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der Methoden zur Bestimmung der Zelltoxizität und der Partikelaufnahme

#### 3.1.1 Partikeltoxizität

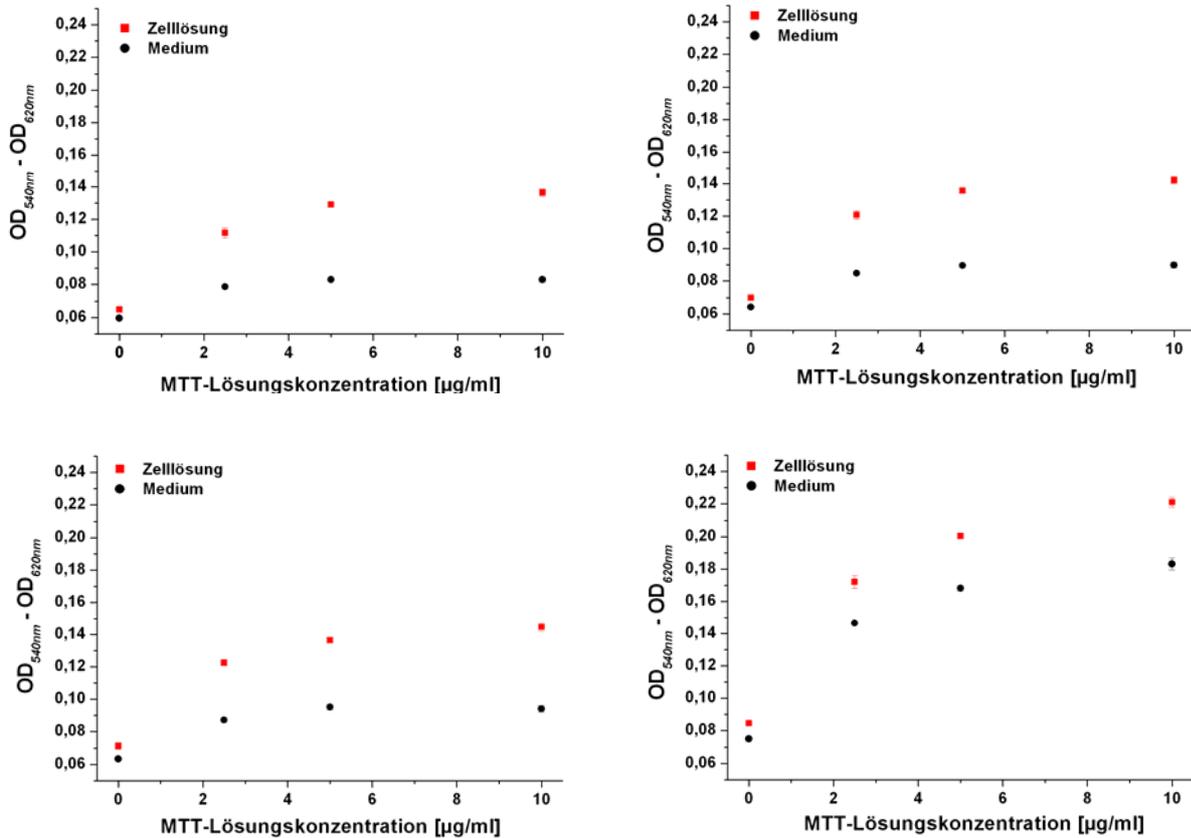
Zelltoxische Eigenschaften sind für viele Partikel *in vivo* und *in vitro* untersucht. Dabei bestimmen sowohl der Partikeltyp als auch die Dosis die Toxizität (Warshawsky et al 1994, Hart et al 1998, Xu et al 2002). Da der Mechanismus der Partikelaufnahme an vitalen Zellen, ohne Beeinflussung der Aufnahme durch zelltoxische Partikeleffekte, untersucht werden sollte, war zunächst ein umfassendes Toleranzdesign der verschiedenen Partikel erforderlich. Um die Zelltoxizität einer Substanz zu untersuchen, können verschiedene methodische Ansätze wie z.B. die Trypanblaufärbung (Farbstoffaufnahme infolge einer Zellmembranschädigung), die Messung der LDH-Abgabe (Freisetzung von Enzymen durch die geschädigte Membran) oder der MTT-Assay (Untersuchungen der Beeinflussung des Zellmetabolismus) genutzt werden.

##### 3.1.1.1 Evaluierung eines MTT-Assays zur Untersuchung der Partikeltoxizität in Suspensionszellkulturen

Zunächst sollte die Zellvitalität der NR8383 Zellen mittels eines MTT-Assay ermittelt werden. Der klassische bereits etablierte MTT-Assay für adherente Zellkulturen, konnte jedoch bei der Untersuchung der NR8383 Makrophagenzelllinie nicht angewendet werden, da es sich um eine Mischkultur aus anheftenden und suspendierten Zellen handelt. Bei der Durchführung des standardisierten MTT-Assay käme es, durch das Verwerfen von Überständen, zu einem Verlust der suspendierten Zellen. Die Bestimmung der Vitalität würde sich somit auf die adherenten Zellen beschränken. Die Untersuchung der vollständigen Mischkultur, die in der folgenden Studie eingesetzt werden sollte, erforderte daher die Etablierung eines MTT-Assays, der ein vollständiges Bild der Vitalität der Zellen in Kultur liefert. Dazu musste der standardisierte MTT-Assay so modifiziert werden, dass er ohne Zellverluste durchgeführt werden konnte. Partikelbelastung, MTT-Reduktion und Lösen der gebildeten Formazankristalle müssen dafür in einem Lösungsansatz ablaufen, wobei mögliche Interferenzen der einzelnen Substanzen zu Fehlinterpretation der Messergebnisse führen könnten (Dias et al 1999).

Die Standardisierung des MTT-Assays zur Vitalitätsbestimmung in Suspensionskulturen erforderte die Optimierung der Reaktionsbedingungen. Da das Medium bei der Messung nicht entfernt wird, können Mediumskomponenten die Messung der optischen Dichte bei 540nm und 620nm beeinflussen. Es kann zu Interferenzen mit den gemessenen

Absorptionen des reduzierten Formazan-Produkts kommen, die die Assaysensitivität herabsetzen. Um diese Effekte zu minimieren musste zunächst eine optimale MTT-Konzentration bei einer idealen DMSO-Inkubationszeit (zeitliche Stabilität des Formazans in Medium) ermittelt werden. Dazu wurden die optischen Dichten des Formazan-Reduktionsprodukts in einer Zelllösung bei verschiedenen MTT-Konzentrationen (2,5µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml) und DMSO-Inkubationszeiten (30min, 1h, 2h und 16h) mit der Absorption des unreduzierten Tetrazoliumsalses in Medium verglichen (Abb. 3.1.1.1.1).



**Abb. 3.1.1.1.1:** Optische Dichten (Mittelwerte der Differenz (OD<sub>540nm</sub> - OD<sub>620nm</sub>) ± SEM, n=4) des gelösten Formazanreduktionsproduktes in einer Zelllösung im Vergleich zum unreduzierten Tetrazoliumsalses in Medium bei verschiedenen MTT-Konzentrationen (2,5µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml) und DMSO-Inkubationszeiten (30min, 1h, 2h und 16h).

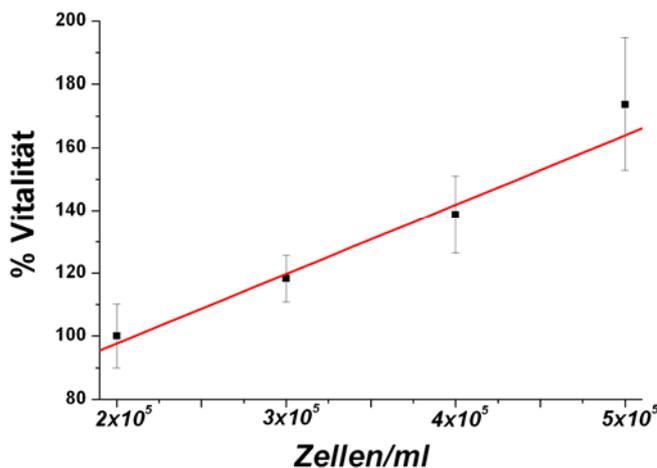
Der Abstand zwischen der Absorption des Tetrazoliumsalses in Medium und der Absorption der gelösten Formazankristalle vergrößert sich bei allen DMSO-Inkubationszeiten durch die Erhöhung der MTT-Konzentration von 2,5µg/ml auf 5µg/ml und 10µg/ml. Die Erhöhung der MTT-Konzentration auf 10µg/ml scheint sich jedoch nicht proportional auszuwirken. Eine Konzentration von 5µg/ml sollte somit optimal für die Auftrennung der Absorptionen sein. Des Weiteren verringert sich mit länger werdender DMSO-Inkubationszeit der Abstand zwischen der Absorption des Tetrazoliumsalses in Medium und des Formazans. Die Stabilität des Formazan-Produkts nimmt innerhalb von 16h ab. Eine geringere DMSO-

Inkubationszeit ist also von Vorteil. In der statistischen Analyse konnte bei allen MTT-Konzentrationen und DMSO-Inkubationszeiten keine signifikanten Interferenzen zwischen der Absorption des unreduzierten Tetrazoliumsalses in Medium und der gemessenen optischen Dichte des gelösten Formazan-Produkts in Medium festgestellt werden. Es ergibt sich jedoch eine maximale Unterscheidung bei einer MTT-Konzentration von 5µg/ml nach einer DMSO-Inkubationszeit von 1h, sodass diese Versuchsparameter für den MTT-Assays eingesetzt wurden (Tab. 3.1.1.1.1).

DMSO-Inkubationszeit [h]	MTT-Lösungskonzentration [µg/ml]	p
0,5	2,5	1,55x10 <sup>-8</sup>
0,5	5	9,12x10 <sup>-18</sup>
0,5	10	4,52x10 <sup>-16</sup>
1	2,5	4,49x10 <sup>-11</sup>
1	5	4,86 x10 <sup>-19</sup>
1	10	2,67x10 <sup>-15</sup>
2	2,5	1,61x10 <sup>-12</sup>
2	5	4,39x10 <sup>-13</sup>
2	10	8,08x10 <sup>-15</sup>
16	2,5	1,55x10 <sup>-5</sup>
16	5	1,86x10 <sup>-10</sup>
16	10	6,74x10 <sup>-8</sup>

**Tab. 3.1.1.1.1:** Ergebnisse der Signifikanzanalyse (Student-t-tests, Signifikanz = p, n=4) der Interferenz zwischen der Absorption des unreduzierten Tetrazoliumsalses und des gelösten Formazan-Produkts in Medium nach 30min, 1, 2 und 16h DMSO-Inkubation bei MTT-Konzentrationen von 2,5, 5 und 10µg/ml.

Im nächsten Etablierungsschritt des MTT-Assays wurde die Proportionalität der mitochondrialen Aktivität (proportional zur Zellanzahl) und der gemessenen optischen Dichte des reduzierten Formazan-Produkts durch die Bestimmung der Vitalität in einem Zellgradienten überprüft (Abb. 3.1.1.1.2).

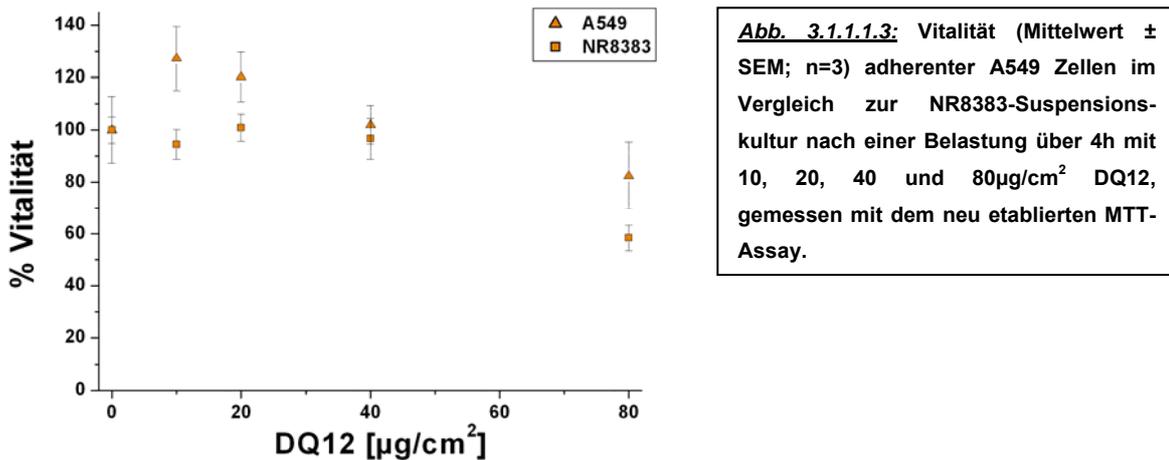


**Abb. 3.1.1.1.2:** Linearere Anstieg (linearer Regressionskoeffizient (R) = 0,99) der im MTT-Assay gemessenen Vitalität (Mittelwert ± SEM, n=1, in 8 Ansätzen) im Zellgradienten.

Die aus der optischen Dichte berechnete Vitalität steigt linear mit steigender Zellkonzentration. Aus einer linearen Regression ergibt sich ein Regressionskoeffizient (R) von 0,99. Die im MTT-Assay gemessenen optischen Dichten, die zur Bestimmung der Vitalität eingesetzt wurden, sind demnach proportional zur Zellzahl welche dem

mitochondrialen MTT-Umsatz entspricht. Dadurch konnte die Funktionalität des neu etablierten MTT-Assays demonstriert werden.

In einem abschließenden Schritt wurde der neu etablierte MTT-Assay an A549 Zellen, deren Toxizitätsprofil aus dem standardisierten MTT-Assay bekannt ist (Cakmak et al. 2004), im Vergleich zu NR8383 Zellen nach Belastungen über 4h mit verschiedenen DQ12-Dosen (10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) überprüft (Abb. 3.1.1.1.3).



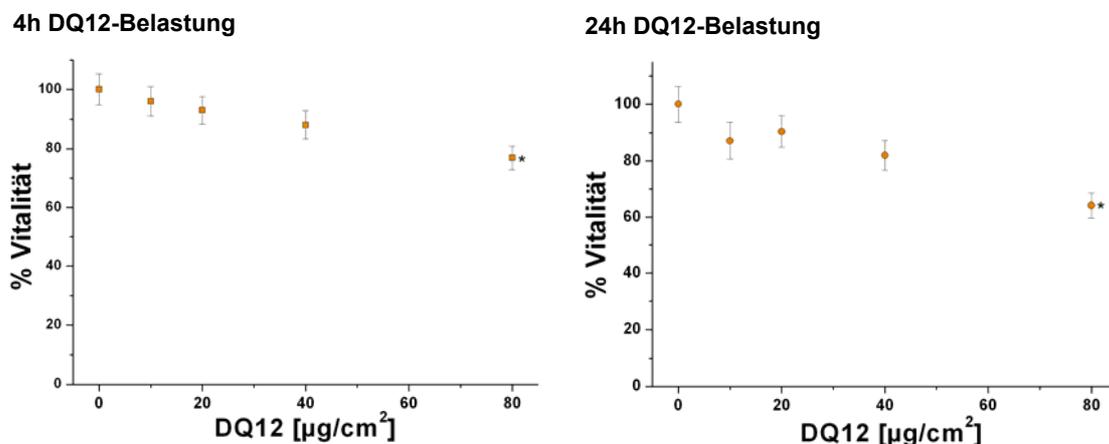
Die ermittelten Vitalitäten, welche gegen die Partikelkonzentrationen aufgetragen wurden, zeigen bei DQ12-Dosen von 10, 20 und 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  keine Beeinflussung der Vitalität in NR8383 Zellen. Erst bei einer Quarz-Konzentration von 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  sinkt die Vitalität merklich ab. In A549 Zellen erhöht die Belastung mit DQ12-Dosen von 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  die Vitalität, die von 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Quarz nicht beeinflusst wird. Dagegen senkt eine Dosis von 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12 auch die Vitalität von A549 Zellen geringfügig. Dieses mit dem neu etablierten MTT-Assay gemessene Toxizitätsmuster von DQ12 in A549 Zellen entspricht in etwa dem, welches bereits in dem für adherente Zellen standardisierten MTT-Assay an A549 Zellen gemessen werden konnte (Cakmak et al. 2004).

Beide Ergebnisse, die Messung der Vitalität im Zellgradienten als auch die Übereinstimmung des Vitalitätsmusters im standardisierten und neu etablierten MTT-Assay in A549 Zellen, zeigten, dass der MTT-Assay für Suspensionszellkulturen zur Bestimmung der Toxizität verschiedener Partikel in NR8383 Zellen einsetzbar ist.

### 3.1.1.2 Vergleich verschiedener zelltoxikologischer Messmethoden zur Bestimmung der DQ12 Zelltoxizität in NR8383 Zellen

Zur Untersuchung der Sensitivität des neu etablierten MTT-Assays erfolgte ein Vergleich von verschiedenen toxikologischen Messmethoden zur Bestimmung der Zelltoxizität an NR8383 Zellen nach Belastung über 4h und 24h mit steigenden DQ12 Konzentrationen (10, 20, 40 und 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

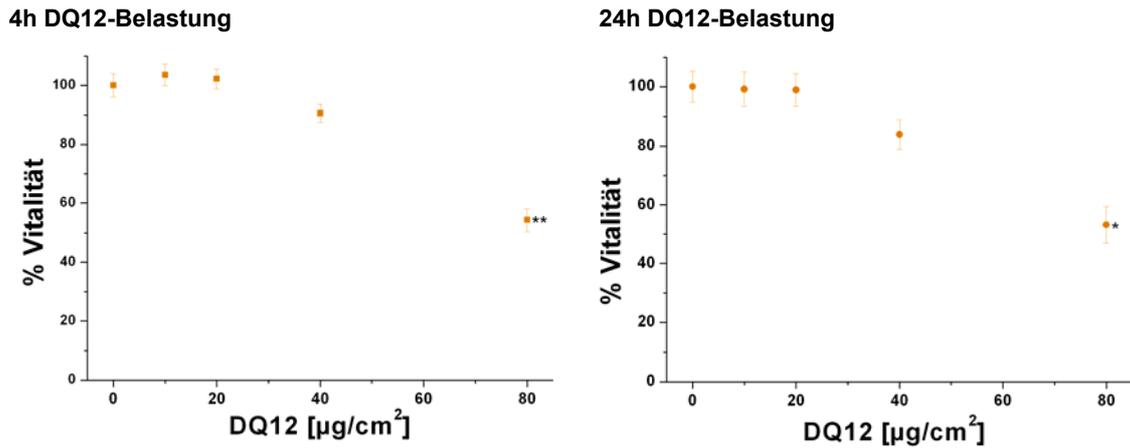
Die Bestimmung der DQ12 Zelltoxizität mit dem neu etablierten MTT-Assay ergab für beide Belastungszeiten bis zu einer Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  keine Vitalitätsbeeinflussung in den NR8383 Zellen. Erst bei einer Quarzdosis von 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zeigten sich nach beiden Belastungszeiten signifikante zelltoxische Wirkungen (Abb. 3.1.1.2.1).



**Abb. 3.1.1.2.1:** Mit dem neu etablierten MTT-Assay gemessene Vitalität (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3; \*  $\equiv$   $p < 0,05$ ; Student-t-Test) der NR8383 Zellen nach einer Belastung über 4h und 24h mit 10, 20, 40 und 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12.

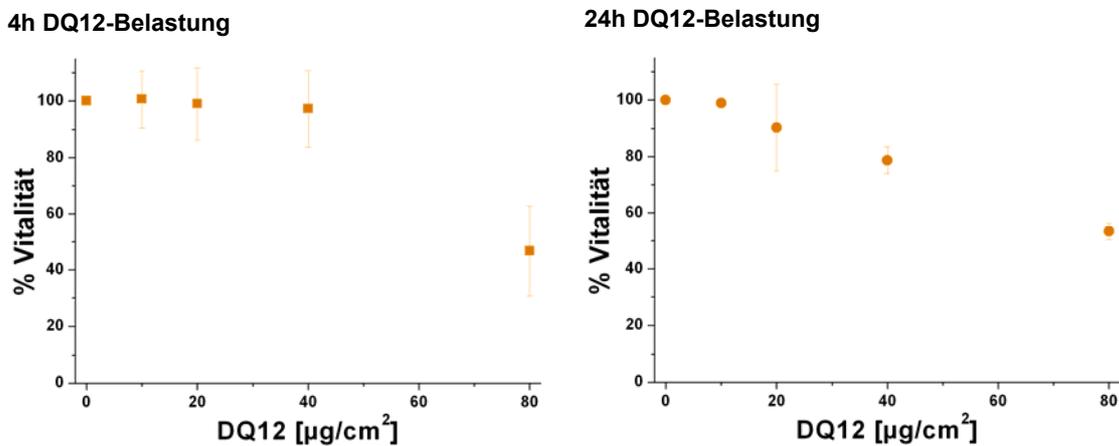
Als nächstes wurde die Vitalität durch einen MTS-Assay untersucht. MTT- und MTS-Assay beruhen zwar auf demselben Prinzip (mitochondriale Reduktion des Tetrazoliumsalzes zu einem Formazan-Produkt), unterscheiden sich allerdings in der Löslichkeit des gebildeten Formazankristalle. Der Vorteil des MTS-Assays liegt in der Wasserlöslichkeit des Formazan-Produkts, wodurch er als Vitalitätstest in einem Lösungsansatz konzipiert ist.

Auch der MTS-Assay ergab, dass die Vitalität der NR8383 Zellen nach beiden Belastungszeiten (4, 24h) durch Quarzdosen von bis zu 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  unbeeinflusst bleibt, dagegen aber bei 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikant reduziert wird (Abb. 3.1.1.2.2). Dieses Resultat entspricht der durch den MTT-Assay ermittelten DQ12 Zelltoxizität.



**Abb. 3.1.1.2.2:** Mit dem MTS-Assay gemessene Vitalität (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3; \*  $\equiv$  p<0,05, \*\* $\equiv$  p<0,01; Student-t-test) von NR8383 Zellen nach einer Belastung über 4h und 24h mit 10, 20, 40 und 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12.

Nun wurde die Auszählung einer Trypanblaufärbung, die auf der Farbstoffinklusion infolge geschädigter Zellmembranen beruht, genutzt um die Vitalität DQ12 belasteter Zellen zu untersuchen. Die aus der Anzahl geschädigter NR8383 Zellen zur Gesamtzellzahl berechnete Zelltoxizität zeigt bis zu einer DQ12 Konzentrationen von 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  keine Vitalitätsbeeinflussung infolge der 4 oder 24h Belastung. Eine Quarz-Dosis von 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  dagegen zeigt auch bei diesem Zelltoxizitätstest nach beiden Belastungszeiten eine zelltoxische Wirkung (Abb. 3.1.1.2.3).

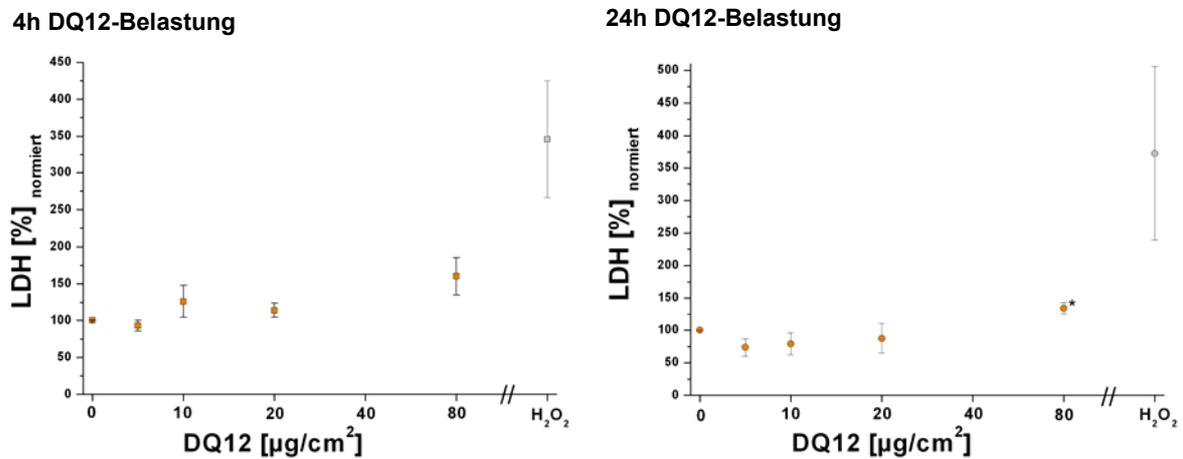


**Abb. 3.1.1.2.3:** Mittels Trypanblaufärbung bestimmte Vitalität (Mittelwert  $\pm$  SEM, n=3) von NR8383 Zellen nach einer Belastung über 4h und 24h mit 10, 20, 40 und 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12.

Durch die Trypanblaufärbung konnte eine ähnliche DQ12 induzierte Zelltoxizität ermittelt werden, wie durch die metabolischen Messmethoden (MTT, MTS) und auch der abschließend durchgeführte LDH-Assay, der wie die Trypanblaufärbung auf einer Schädigung der Zellmembran beruht, zeigte ähnliche Zelltoxizitätsresultate.

Im Gegensatz zur genutzten Farbstoffinklusion wird im LDH-Assay die Freisetzung des zytosolischen, nicht zellmembranpermeablen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) durch

die geschädigte (leckende) Zellmembran gemessen. Dabei wurden die Ergebnisse der Messung als Enzymfreisetzung in % der Kontrolle dargestellt. Die Belastung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  diente zusätzlich als Positivkontrolle (Abb. 3.1.1.2.4).



**Abb. 3.1.1.2.4:** LDH-Freisetzung dargestellt als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=3$ ; \*  $\equiv p<0,05$ ; Student-*t*-test) nach Quarz (10, 20, 40 und  $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12)- oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200\mu\text{M}$ )-Belastung von NR8383 Zellen über 4h und 24h.

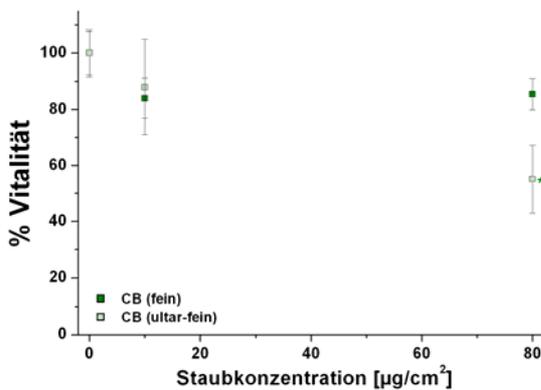
Bis zu einer DQ12 Konzentration von  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zeigt sich keine zur Kontrolle erhöhte LDH-Freisetzung. Erst ab einer Quarzdosis von  $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ist eine erhöhte Abgabe feststellbar, die jedoch erst nach einer Belastungszeit von 24h Signifikanz zeigt. Ein Freisetzungsniveau wie bei der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200\mu\text{M}$ ) wird jedoch nicht erreicht.

Die Ergebnisse aller Zelltoxizitätstests stimmen überein. Dabei zeigen DQ12 Konzentrationen bis zu  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  keinen Einfluss auf die Vitalität der NR8383 Zellen. Erst bei einer Quarzdosis von  $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$  tritt ein zelltoxischer Effekt auf. Die folgenden Experimente können also mit Quarzdosen von bis zu  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ohne zelltoxische Effekte durchgeführt werden. Resultierend aus dem Vergleich der verschiedenen Zelltoxizitätstests erweist sich die Verwendung des MTT-Assay als die sinnvollste Variante. Dieser Assay ist zum einen objektiver und weniger zeitaufwendig als die Trypanblaufärbung und weist zum anderen, verglichen mit dem LDH-Assay eine höhere Sensitivität auf. Auch der MTS-Assay wäre aufgrund seiner hohen Sensitivität eine probate Messmethode. Der MTT-Assay ist jedoch bei ähnlicher Sensitivität weitaus kostengünstiger und unabhängiger, da im Gegensatz zum MTS-Assay kein industrielles Kit verwendet wird.

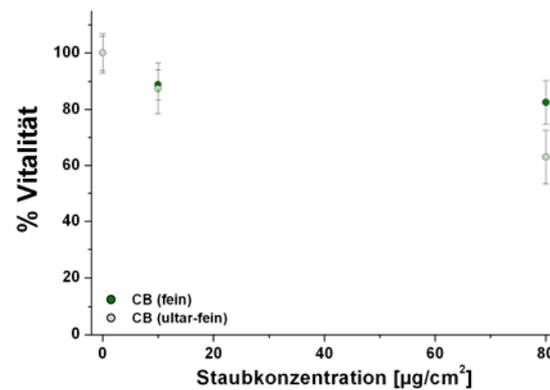
### 3.1.1.3 Bestimmung der Zelltoxizität verschiedener Partikel (CB, TiO<sub>2</sub> (fein, ultrafein) und SWNT's)

Nachdem die Zelltoxizität von DQ12, unter der Etablierung der geeigneten Analyseverfahren, bestimmt worden ist, sollten nun die zelltoxischen Eigenschaften der weiteren in dieser Studie eingesetzten Partikel (CB und TiO<sub>2</sub> (fein und ultra-fein)) an NR8383 Zellen untersucht werden. Zunächst wurde dafür über den MTT-Assay die Vitalität der Makrophagen bei Partikelkonzentrationen von 10µg/cm<sup>2</sup> und 80µg/cm<sup>2</sup> über 4 und 24h ermittelt (Abb. 3.1.1.3.1).

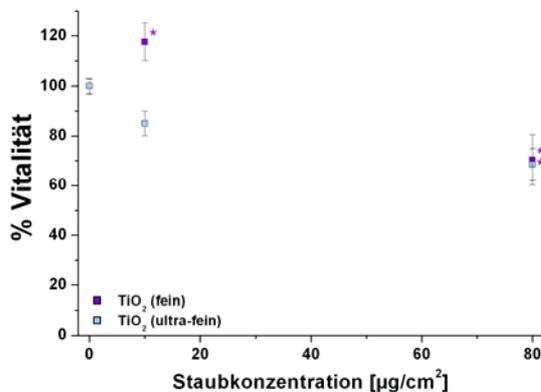
4h-Belastung



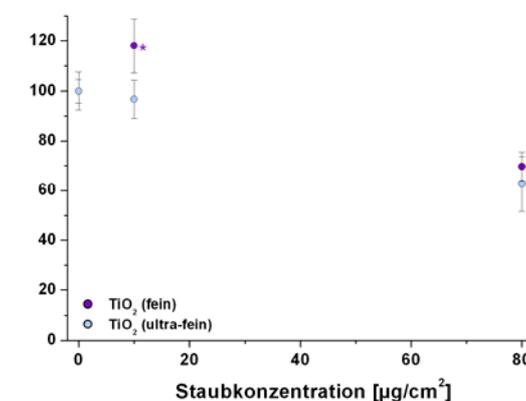
24h-Belastung



4h-Belastung



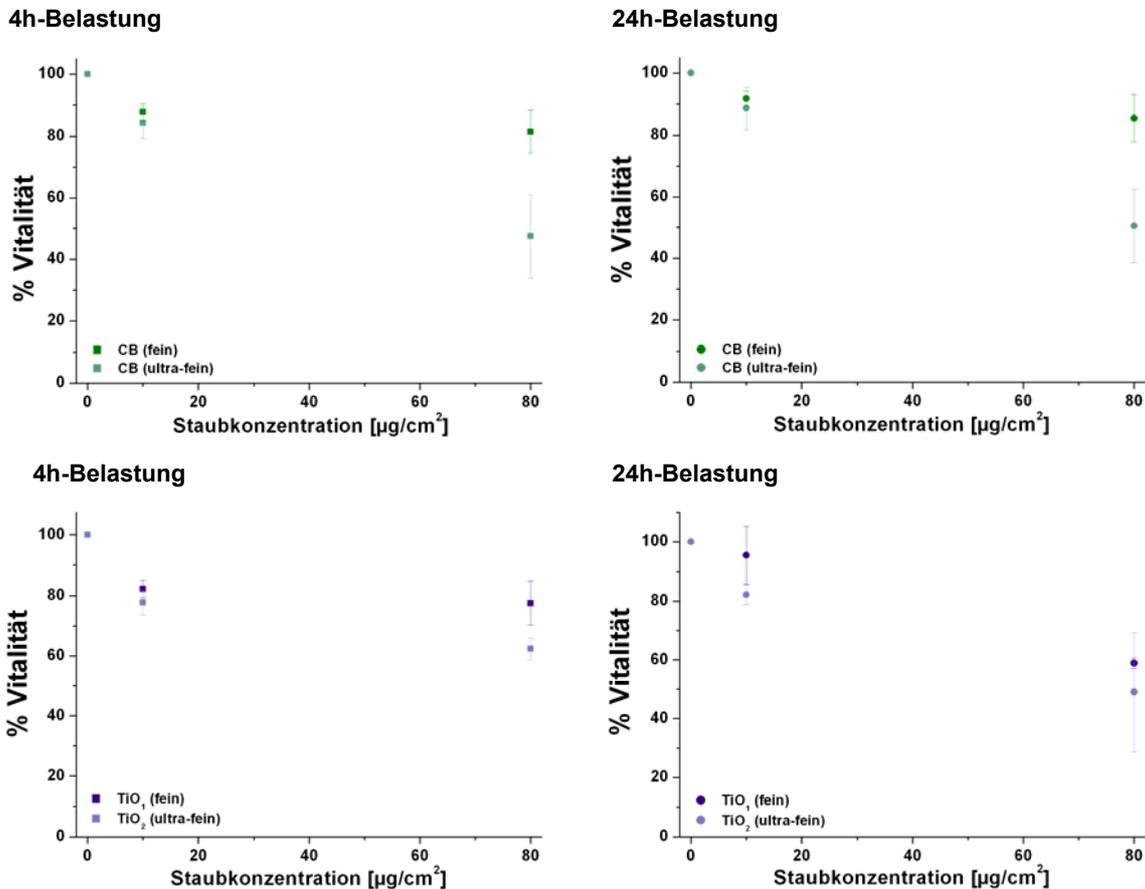
24h-Belastung



**Abb. 3.1.1.3.1:** Vitalität (Mittelwert ± SEM; n=3; \* ≡ p<0,05, \*\* ≡ p<0,01; Student-t-test) von NR8383 Zellen nach einer 4h und 24h Belastung mit feinem und ultra-feinem CB und TiO<sub>2</sub> (10 und 80µg/cm<sup>2</sup>) bestimmt über den MTT-Assays.

Bei einer Belastungskonzentration von 10µg/cm<sup>2</sup> ist bei keiner Partikelart oder Belastungszeit eine zelltoxische Wirkung zu beobachten. Im Fall der TiO<sub>2</sub> (fein)-Belastung erhöht sich die Vitalität bei dieser Dosis sogar signifikant. Die Belastung mit feinem CB führt auch bei dem Einsatz der höheren Partikelkonzentration (80µg/cm<sup>2</sup>) zu keiner signifikanten Verringerung der Vitalität, wohingegen ultra-feines CB nach 4h wie auch nach 24h eine signifikante zelltoxische Wirkung aufweist. Die Belastungen mit feinem und ultra-feinem TiO<sub>2</sub> zeigten in hohen Dosen von 80µg/cm<sup>2</sup> zu beiden Belastungszeitpunkten toxische Eigenschaften.

Da die optischen Eigenschaften der Partikel, die bei den Analysewellenlängen (540 und 620nm) des MTT-Assays absorbieren (Abb. 2.2.3.1.1 Absorptionsspektren der Partikel), die Resultate der Vitalitätsmessung beeinflusst haben könnten, wurde zusätzlich zum MTT-Assay eine Trypanblaufärbung zur Abschätzung der Zelltoxizität durchgeführt (Abb. 3.1.1.3.2).

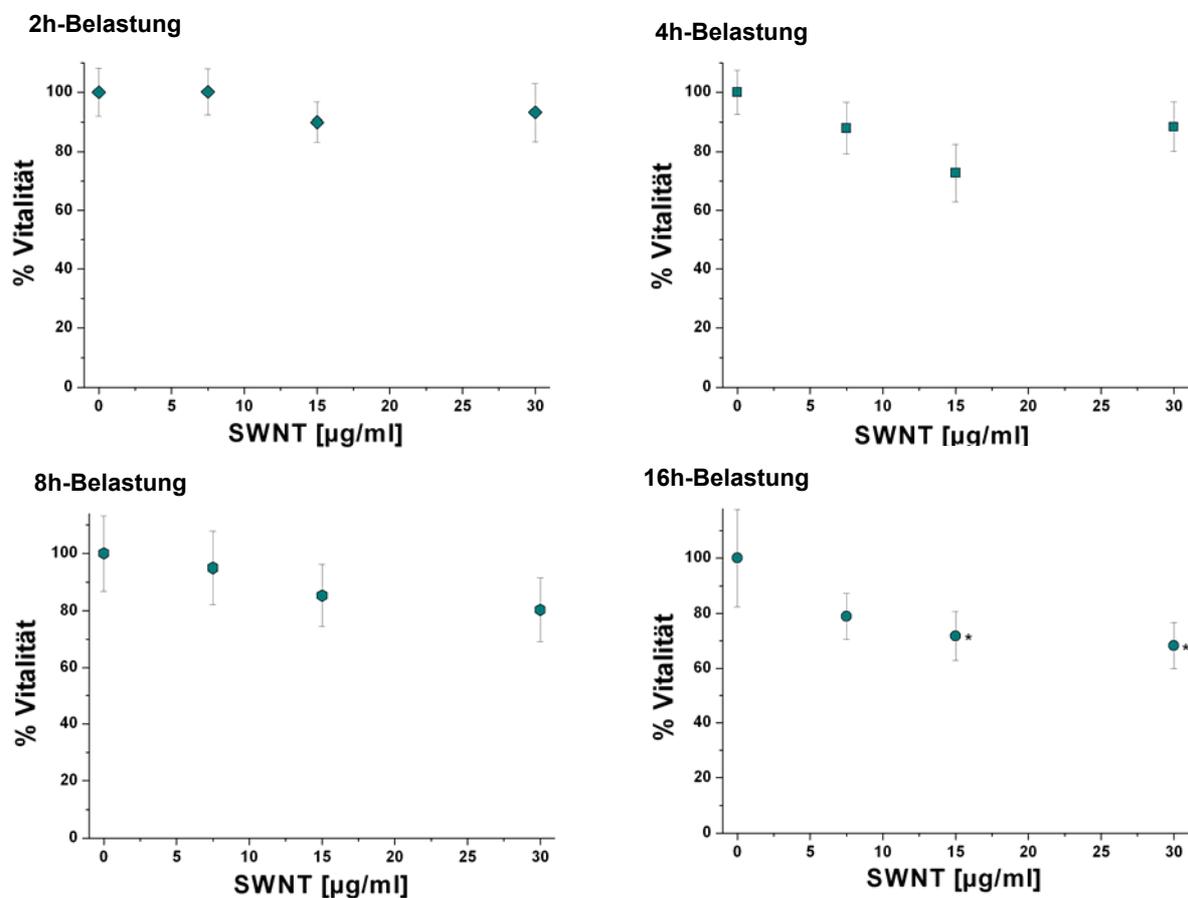


**Abb. 3.1.1.3.2:** Durch eine Trypanblaufärbung bestimmte Vitalität (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3) von NR8383 Zellen nach einer Belastung über 4h und 24h mit feinem und ultra-feinem CB sowie TiO<sub>2</sub> (10 und 80µg/cm<sup>2</sup>).

Für alle Partikel ist bei einer Konzentration von 10µg/cm<sup>2</sup> nach beiden Belastungszeiten keine Einschränkung der Vitalität zu beobachten. Bei höherer Konzentration (80µg/cm<sup>2</sup>) zeigt die Belastung mit feinem CB keine Auswirkungen auf die Vitalität, wohingegen ultra-feines CB diese zu beiden Belastungszeitpunkten absenkt. Feines als auch ultra-feines TiO<sub>2</sub> senken die Zellvitalität nach 4h und 24h Belastung bei hohen Partikeldosen (80µg/cm<sup>2</sup>). Die Ergebnisse der Trypanblaufärbung zeigen vergleichbare zelltoxische Effekte der verschiedenen Partikelbelastungen auf die NR8383 Zellen wie der MTT-Assay, weshalb eine Beeinflussung der Vitalitätsmessung durch die Interferenz der Partikelabsorption mit der MTT-Absorption endgültig ausgeschlossen werden kann.

Resultierend aus beiden Zelltoxizitätstests ergeben sich keine zelltoxischen Eigenschaften für feine CB-Partikel bei beiden Dosen und Belastungszeiten. Exposition zu höheren Konzentrationen von ultra-feinem CB dagegen haben Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen. TiO<sub>2</sub> zeigt bei einer Dosis von 10µg/cm<sup>2</sup> sowohl als feine wie auch als ultra-feine Fraktion keine Zelltoxizität. Belastungen mit der höheren Dosis führen jedoch zur Verringerung der Zellvitalität bei beiden Partikelgrößen. Die zelltoxische Wirkung des TiO<sub>2</sub> ist jedoch geringer als die des ultra-feinen CB. Es resultiert also folgende Toxizitätsreihenfolge: **CB (ultra-fein) >>TiO<sub>2</sub> (ultra-fein) >TiO<sub>2</sub> (fein) > CB (fein).**

Abschließend wurde der Effekt der SWNT-Belastung auf die Vitalität der NR8383 Zellen mit Hilfe des MTT-Assay untersucht (Abb. 3.1.1.3.3).



**Abb. 3.1.1.3.3:** Die mit dem MTT-Assay gemessene Vitalität (Mittelwert ± SEM; n=3, \* ≙ p<0,05; Student-t-test) von NR8383 Zellen nach einer Belastung über 2, 4, 8 und 16h mit 7,5, 15 und 30µg/ml SWNT.

Nach Belastungszeiten von 2, 4 und 8h haben alle eingesetzten SWNT-Konzentrationen (7,5; 15 und 30µg/ml) keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Erst nach einer Belastungszeit von 16h zeigt sich durch die Belastung mit SWNT-Dosen von 15 und 30µg/ml eine signifikante zelltoxische Wirkung.

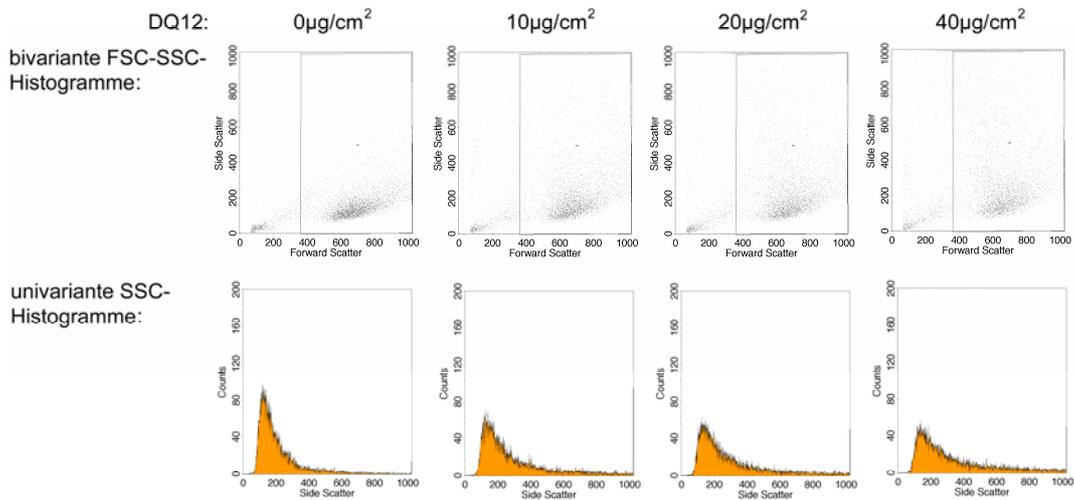
### 3.1.2 Messung der Partikelaufnahme

Zur Bestimmung der Partikelaufnahme können verschiedene Methoden angewandt werden, wie z.B. die Licht- oder Elektronenmikroskopie mit der partikelpositive Zellen oder die Partikel pro Zelle ausgezählt werden können. Diese Methoden sind jedoch sehr zeitaufwendig. Daher musste, zur Ermöglichung einer umfassenden Partikelaufnahmeuntersuchung, der Zeitaufwand minimiert werden. Dies konnte durch die Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode, die zunächst zur Untersuchung der Aufnahme fluoreszierender Latex Beads in Makrophagen beschrieben wurde, erreicht werden. Durch die lineare Abhängigkeit der im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensität ist eine schnelle und genaue Aufnahmerate fluoreszierender Latexpartikel zu bestimmen (Parod et al. 1983). Diese Methode wurde später von Stringer et al. (1995) aufgegriffen und für die Quantifizierung der Aufnahme von Umweltpartikeln modifiziert. Die Autoren konnten zeigen, dass der durchflusszytometrisch gemessene Anstieg des „right angle light scatter“ (RAS) proportional zur Aufnahme von  $\alpha$ -Quarz-,  $\text{TiO}_2$ - oder Dieselpartikeln ist. Diese im Vergleich zur Auszählung weniger präzise -es kann weder unterschieden werden wie viele Partikel pro Zelle aufgenommen wurden noch kann zwischen aufgenommen oder oberflächegebundenen Partikel differenziert werden- aber dafür schnelle Methode sollte nun zur Abschätzung der Partikelaufnahme genutzt werden.

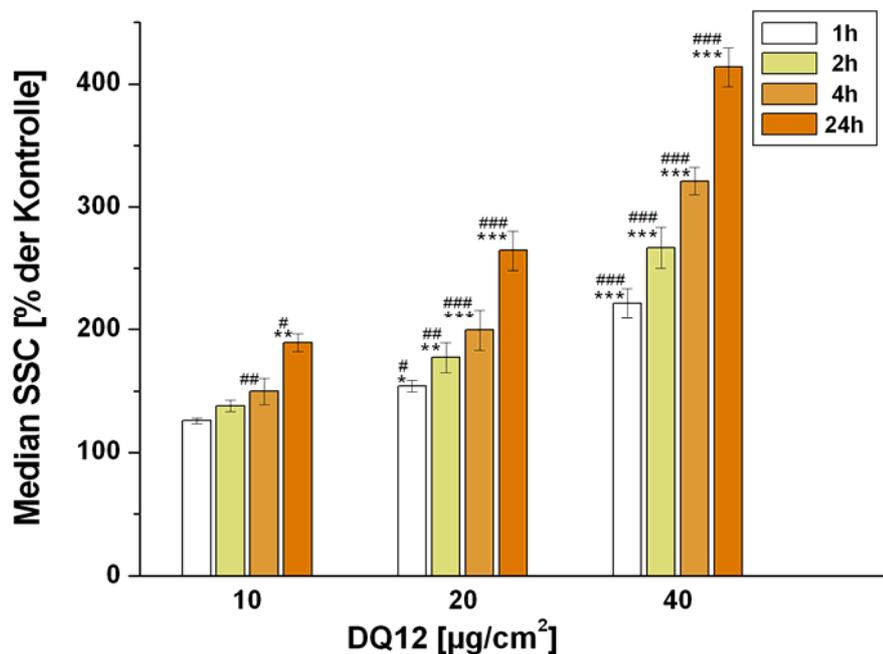
#### 3.1.2.1 Evaluierung der durchflusszytometrischen Messmethode zur Bestimmung der Partikelaufnahme in NR8383 Zellen

Zur Etablierung der Methode wurde zunächst die Dosis- und Zeitabhängigkeit der Quarzaufnahme in NR8383 Zellen durchflusszytometrisch, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, untersucht. *Abb. 3.1.2.1.1* zeigt die Veränderung des seitlichen Streuwinkels (Side-Scatter-Angle, SSC) von NR8383 Zellen nach einer 1h Belastung mit steigenden Quarzkonzentrationen (10, 20, 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Die dosisabhängig steigende Partikelaufnahme ist in den bivarianten SSC-FSC-Histogrammen (*Abb. 3.1.2.1.1*, obere Reihe) an der Zunahme der Signale (Zellen) mit höherer Granularität (SSC) zu verfolgen. Während unbelastete Zellen im unteren Quadranten der bivarianten SSC-FSC-Histogramme erscheinen, steigt die Anzahl der Zellen im oberen Quadranten mit steigenden Quarzkonzentrationen. Zelltrümmer sowie nicht aufgenommene Partikel, die in der vorderen Hälfte der Histogramme erscheinen, wurden durch elektronisches Filtern (gaten) von der Auswertung ausgeschlossen. In den univarianten SSC-Histogrammen (gated, *Abb. 3.1.2.1.1*, untere Reihe) verschiebt sich die Granularitätsverteilung infolge der Partikelaufnahme zu höheren Werten. Das Maximum der Verteilung der Zellgranularität der Kontrolle wird mit steigender DQ12-Dosis breiter und verschiebt sich zu höheren Werten des SSC. Aus den univarianten SSC-Histogrammen (gated) wurde der Median des SSC als Maß für die Partikelaufnahme ermittelt. Der zur Partikelaufnahme proportionale Median des SSC, dargestellt in % der Kontrolle, erhöht sich

mit steigender DQ12-Dosis (10, 20 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) sowie mit steigender Belastungszeit (1, 2, 4 und 24h, *Abb. 3.1.2.1.2*).



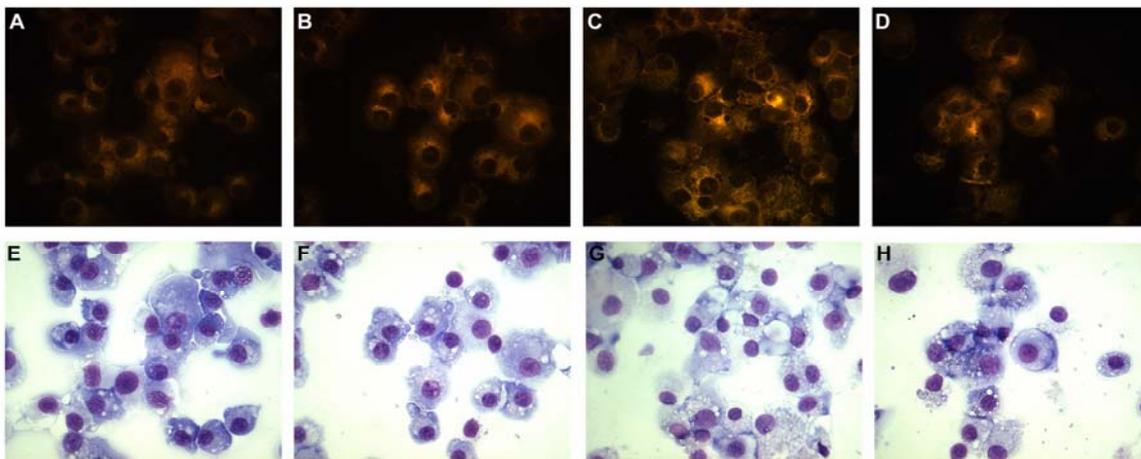
**Abb. 3.1.2.1.1:** Repräsentative bivariate SSC/FSC(side-scatter-/ forward-scatter-angle)-Histogramme und univariate SSC-Histogramme (gated,) zur Untersuchung der Veränderung des seitlichen Streuwinkels (Side-Scatter-Angle, SSC) als Maß der Partikelaufnahme, von unbelasteten NR8383 Zellen (Kontrolle, 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und Makrophagen, die über 1h führt mit steigenden DQ12-Konzentration (10-, 20- und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) belastet wurden.



**Abb. 3.1.2.1.2:** Dosis- und zeitabhängige Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle ( $\cong 100\%$ )  $\pm$  SEM; n=4; \*, #  $\equiv$  p<0,05, \*\*, ##  $\equiv$  p<0,01, \*\*\*, ###  $\equiv$  p<0,001; \*  $\equiv$  Dosisabhängigkeit, #  $\equiv$  Zeitabhängigkeit; Varianzanalyse, 95% Konfidenzintervall) durch die Belastung mit Quarz (10-, 20- und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; 1, 2, 4 und 24h) als Maß der Partikelaufnahme.

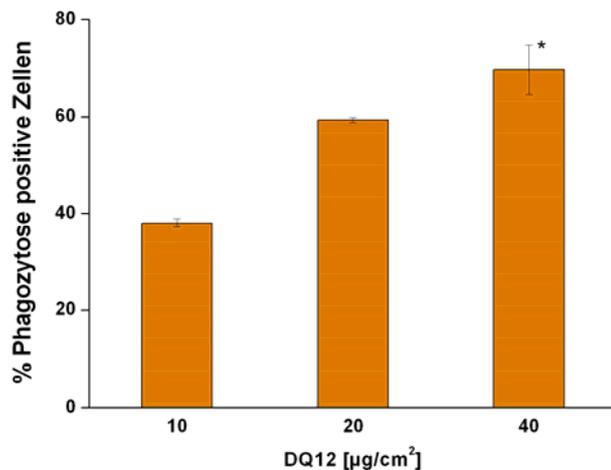
Die Erhöhung der Granularität zeigt eine dosis- und zeitabhängige Partikelaufnahme. Weiter lassen die Ergebnisse der Messung erkennen, dass die Partikelaufnahme eine frühe, schnelle und sensitive Reaktion der Makrophagen auf die Partikelexposition ist. Signifikante Granularitätserhöhungen lassen sich bereits innerhalb einer einstündigen Belastung mit Quarzdosen von 20 und 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  beobachten. Belastungen mit der niedrigsten DQ12-Konzentration ( $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) zeigen nach 4h eine signifikante Partikelaufnahme. Die Aufnahme scheint allerdings unter den experimentellen Bedingungen keine Sättigung zu erreichen.

Im Anschluss wurde nun die Genauigkeit der im Durchflusszytometer als Anstieg der Granularität gemessenen Partikelaufnahme durch eine mikroskopische Methode überprüft. Dies erfolgte durch die Auszählung der Partikelaufnahme an MGG gefärbten Zytospinpräparationen von NR8383 Zellen nach einer 4h Belastung mit steigender Quarzkonzentration (10, 20, 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). In *Abb. 3.1.2.1.3* sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (oberen Reihe) sowie Aufnahmen im Phasenkontrast (untere Reihe) von Ausschnitten dieser Zytospinpräparationen abgebildet.



**Abb. 3.1.2.1.3:** Repräsentative (n=3, Vergrößerung: x 1000) Fluoreszenz-(Anregungswellenlänge: 555nm, obere Reihe, mit: A = Kontrolle, B =  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , C =  $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , D =  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und Phasen-Kontrast-(untere Reihe, E = Kontrolle, F =  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , G =  $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , H =  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Aufnahmen MGG (May-Grünwald-Giemsa) gefärbter Zytospinpräparationen. Die NR8383 Zellen wurden nach einer 4h Belastung mit steigender Quarzkonzentration (10, 20 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) gefärbt.

In den Fluoreszenzaufnahmen (obere Reihe, von links nach rechts, mit: A = Kontrolle, B =  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , C =  $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , D =  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) steigt, verursacht durch die mit einer Wellenlänge von 555nm angeregte DQ12-Eigenfluoreszenz, die Fluoreszenzintensität mit steigender Quarzdosis in Folge der Partikelaufnahme. Die untere Reihe zeigt die gleichen mikroskopischen Ausschnitte im Phasen-Kontrast. Die Partikelaufnahme (Phagozytose positive Zellen) wurde anhand solcher Aufnahmen für eine steigende DQ12-Konzentration (mit E = Kontrolle, F =  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , G =  $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , H =  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) nach einer 4h Belastung für je 100 Zellen pro Zytospin ausgezählt und in % der Phagozytose positive Zellen dargestellt (*Abb. 3.1.2.1.4*).



**Abb. 3.1.2.1.4:** Durch die Auszählung Phagozytose positiver NR8383 Zellen (100 Zellen pro Phasen-Kontrast-Aufnahme MGG (May-Giemsa-Grünwald) gefärbter Zytopspinpräparationen, n=3, \* ≡ p<0,05, SPSS, Turkey-Test) bestimmte dosisabhängige Partikelaufnahme nach einer 4h Belastung mit steigender DQ12-Dosis (10-, 20- und 40µg/cm<sup>2</sup>).

Auch diese Methode zeigte eine Dosisabhängigkeit der Partikelaufnahme, die bei einer Belastungskonzentration von 40µg/cm<sup>2</sup> Signifikanz erreicht. Diese mikroskopischen Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten der durchflusszytometrischen Messung, unterscheiden sich allerdings in der Höhe der Messergebnisse (Tab.3.1.2.1.1), was auf die unterschiedlichen Messmethoden zurückzuführen ist.

DQ12	10µg/cm <sup>2</sup>		20 µg/cm <sup>2</sup>		40 µg/cm <sup>2</sup>	
	durchfluss-zytometrisch	mikroskopisch	durchfluss-zytometrisch	mikroskopisch	durchfluss-zytometrisch	mikroskopisch
%Partikelaufnahme	49,77 ±10,74	38,12 ±8,13	99,54 ±16,55	59,31 ±7,82	221,05 ±11,08	69,60 ±2,16

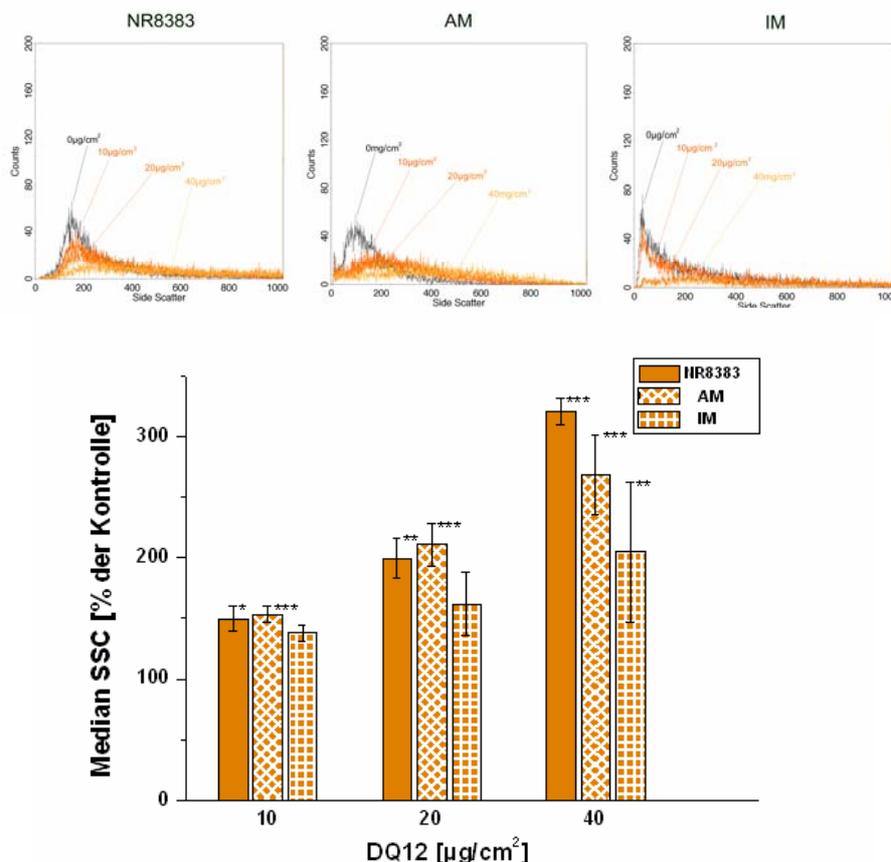
**Tab.3.1.2.1.1:** Vergleich der durchflusszytometrisch (Erhöhung des Median SSC zur Kontrolle) und mikroskopisch (Auszählung der Phagozytose positiven Zellen) bestimmten Messwerte der Partikelaufnahme (in Prozent der Kontrolle ≡ 100%) nach einer 4h Belastung mit DQ12-Dosen von 10, 20 und 40 µg/cm<sup>2</sup>.

Bei der Durchflusszytometrie wird die Verschiebung des Median SSC als Maß der Partikelaufnahme genutzt. Ohne zwischen ihnen exakt differenzieren zu können, verschiebt sich das SSC-Signal von Zellen, die mehrere Partikel aufgenommen haben, im Gegensatz zu Zellen mit nur einem aufgenommenen Partikel, zu höheren SSC-Signalen. Es wird die Aufnahme mehrerer Partikel mit einbezogen, welches sich durch eine stärkere Verschiebung des Median SSC auf das Endergebnisse auswirkt. Die mikroskopische Methode, wie sie in dieser Studie angewandt wurde, berücksichtigt dagegen nur die Anzahl der Zellen die Partikel aufgenommen haben, ohne Einbeziehung der Anzahl aufgenommener Partikel pro Zelle. Dies erklärt die höheren Werte bei der durchflusszytometrischen Messung. Die Ergebnisse zeigen jedoch eine Proportionalität, wodurch die Durchflusszytometrie als effizient durchzuführende Methode für die Bestimmung der Partikelaufnahme eingesetzt werden kann. Ein besonderer Vorteil ist, dass sie einen hohen Probendurchsatz, sowie die Untersuchung einer großen Zellzahl pro Probenansatz auf Einzelzellniveau ermöglicht.

### 3.1.2.2 Evaluierung des Zellsystems zur Untersuchung der Partikelaufnahme (Vergleichbarkeit der Zelllinie NR8383 mit primären Makrophagen)

Für eine realistische Untersuchung der Aufnahmemechanismen würden sich am besten primäre alveolare Makrophagen eignen. Problematisch an primäre Zellen ist jedoch, dass sie sich nur sehr aufwendig in geringen Zahlen gewinnen lassen und eine hohe Variabilität durch interindividuelle Unterschiede des Spendertiers aufweisen. Zelllinien dagegen bieten den Vorteil, dass unter geringem Zeitaufwand eine hohe Biomasse mit geringer Varianz erzeugt werden kann. Allerdings können sie, aufgrund zur Kultivierung nötiger Modifikationen (z.B. Immortalisierung), einen unterschiedlichen Phänotyp als ihre Herkunftszelle aufweisen. Daher sollte nun die Einsetzbarkeit der alveolaren Makrophagenzelllinie NR8383 als *in vitro* Modell zur Untersuchung des Mechanismus der Partikelaufnahme analysiert werden. Dies erfolgte durch den Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen Partikelaufnahme in der Zelllinie mit der Aufnahme in primären alveolaren und interstitiellen Makrophagen nach einer 4h DQ12 Belastung (10, 20 und 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Abb. 3.1.2.2.1).

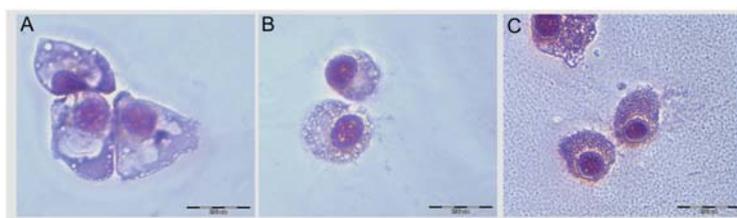
SSC-Überlagerungshistogramme von:



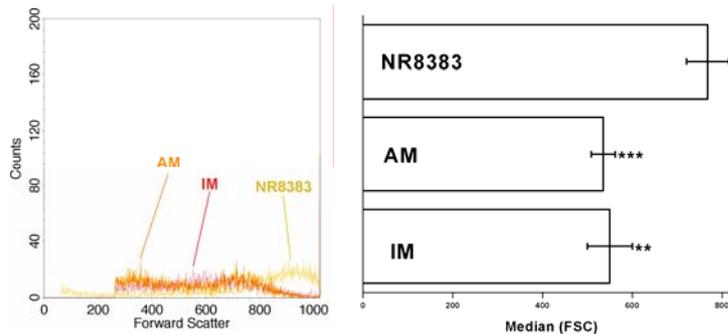
**Abb. 3.1.2.2.1:** Repräsentative univariante SSC (Side-Scatter-Angle)-Überlagerungs-Histogramme (gated) unbelasteter ( $0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Kontrolle) sowie mit verschiedenen Quarzdosen (10, 20 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 4h) belasteter NR8383 Zellen, primärer alveolarer Makrophagen (AM) und interstitieller Makrophagen (IM).

Eine ähnliche dosisabhängige Erhöhung des Median SSC (Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv 100\%$ )  $\pm$  SEM;  $n=3$ , \*  $\equiv p<0,05$ , \*\*  $\equiv p<0,01$ , \*\*\*  $\equiv p<0,001$ ; Varianzanalyse, 95% Konfidenzintervall) ist in allen 3 Zelltypen (NR8383, primäre AM und IM) mit steigender DQ12-Dosis (10-, 20- und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 4h) zu beobachten.

In den univariaten SSC-Überlagerungs-Histogrammen (gated, Overlays) der verschiedenen Zelltypen (NR8383 Zellen, alveolaren und interstitiellen Makrophagen) verschiebt sich nach einer 4h Quarzbelastung (10, 20 und 40µg/cm<sup>2</sup>) das Maximum der Granularitätsverteilung im Vergleich zur Kontrolle zu einem höheren SSC-Signal. Es ergibt sich ein dosisabhängiger Anstieg der Granularität, der sich bei allen Zelltypen und Quarzdosen signifikant von den Kontrollen unterscheidet. Signifikante Unterschiede in der Partikelaufnahme zwischen den Zelltypen treten nicht auf. Die interstitiellen Makrophagen scheinen jedoch weniger Partikel aufzunehmen. Um auszuschließen, dass die verringerte Aufnahme der interstitiellen Makrophagen Folge eines Größenunterschiedes ist, wurden sowohl mikroskopische als auch durchflusszytometrische Untersuchungen der Größen durchgeführt (Abb. 3.1.2.2.2).



FSC-Überlagerungs-Histogramm



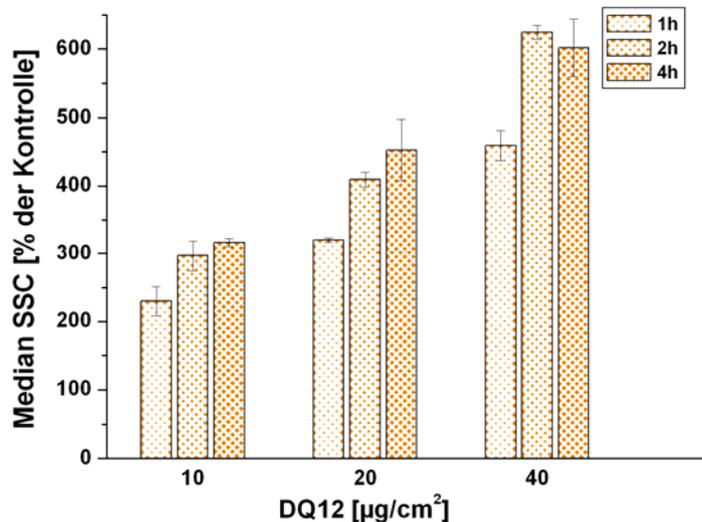
**Abb. 3.1.2.2.2:** Repräsentative Phasen-Kontrast Aufnahmen (obere Reihe, original Vergrößerung: x 1000, n=3) MGG (May-Giemsa-Grünwald) gefärbter Zytospinpräparationen von NR8383 Zellen (A) und primären alveolaren (AM, B) und interstitiellen (IM, C) Makrophagen. Repräsentatives univariates FSC-Überlagerungs-Histogramm (links, unten) und der daraus ermittelte Median FSC (rechts unten, Mittelwert ± SEM; n=3; \*\* ≡ p<0,01, \*\*\* ≡ p<0,001) für NR8383 Zellen und primären AM und IM.

Die mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.1.2.2.2, oben) zeigen, dass zwischen der Zelllinie (A) und den primären alveolaren (B) und interstitiellen Makrophagen (C) ein Größenunterschied vorliegt, der sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung des FSC bestätigt. Im FSC-Überlagerungsdiagramm liegt das Maximum des FSC der primären Makrophagen bei geringeren Werten als das der NR8383 Zelllinie. Aus der Auswertung des Median (FSC) ergibt sich ein signifikanter Größenunterschied von 40% zwischen Zelllinie und beiden primären Makrophagentypen. Die geringere Partikelaufnahme der interstitiellen Makrophagen könnte auf einen Größenunterschied, wie von Zetterberg et al. 1998 beschrieben, beruhen. Allerdings kann diese Erklärung nicht hinreichend sein, da auch die alveolaren Makrophagen eine geringere Größe als die Zelllinie bei jedoch gleichem Aufnahmeverhalten aufweisen. Der Vergleich der DQ12-Aufnahme in NR8383 Zellen zu primären alveolaren Makrophagen hat jedoch gezeigt, dass sich die Zelllinie als *in vitro* Modell zur Untersuchung der Partikelaufnahme eignet.

Eine weitere Untersuchung primärer alveolarer Makrophagen beschäftigt sich mit dem Einfluss des Alters, der zur Isolierung der Makrophagen verwendeten Tiere, auf die Aufnahmeeigenschaften. Dazu wurde die Partikelaufnahme an alveolaren Makrophagen von jungen Ratten (geringeres Gewicht) nach 1, 2 und 4h Belastung mit aufsteigenden Quarzdosen (10, 20 und 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.1.2.2.3). In Tabelle 3.1.2.2.1 sind die Angaben über das Gewicht der Tiere, die Anzahl der isolierten Makrophagen pro Tier und pro Gramm sowie die Reinheit der isolierten AM zusammengefasst. Für diesen Studienansatz wurden Tiere mit einem 20% geringeren Körpergewicht (207g) als in den anderen Versuchen (260g) eingesetzt. Zunächst auffällig ist, dass trotz des geringeren Körpergewichts die 3-fache Menge Makrophagen bei nahezu gleicher Reinheit aus den Lungen der jüngeren Ratten isoliert werden konnte.

mittleres Körpergewicht [g]	isolierte Makrophagen pro Ratte	isolierte Makrophagen pro g Ratte	Reinheit %
207	$16 \times 10^5$	$7,73 \times 10^3$	99,0
260	$5,13 \times 10^5$	$1,9 \times 10^3$	99,9

**Tab. 3.1.2.2.1:** Zusammenfassung der Daten (Gewicht der Tiere, Anzahl der isolierten Makrophagen pro Tier sowie pro Gramm; der Reinheit der isolierten Zellen) der jüngeren (6 Tiere) und älteren (14 Tiere) Ratten.



**Abb. 3.1.2.2.3:** Dosis (10, 20 und  $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )- und zeitabhängige (1, 2 und 4h)-Quarzaufnahme in alveolaren Makrophagen isoliert von jungen Tieren ermittelt durch den Median SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv 100\%$ )  $\pm$  SEM; n=1 in 3 Ansätzen mit alveolaren Makrophagen isoliert von 6 Tieren).

Nach DQ12-Belastung lässt sich auch hier eine dosis-, wie auch zeitabhängige Partikelaufnahme verfolgen, die aber im Vergleich zur 4h Belastung der älteren Tiere (siehe Abb. 3.1.2.2.1) etwa doppelt so hoch ist. Dies weist auf eine erhöhte Aufnahmekapazität des Makrophagensystems in jüngeren Tieren hin.

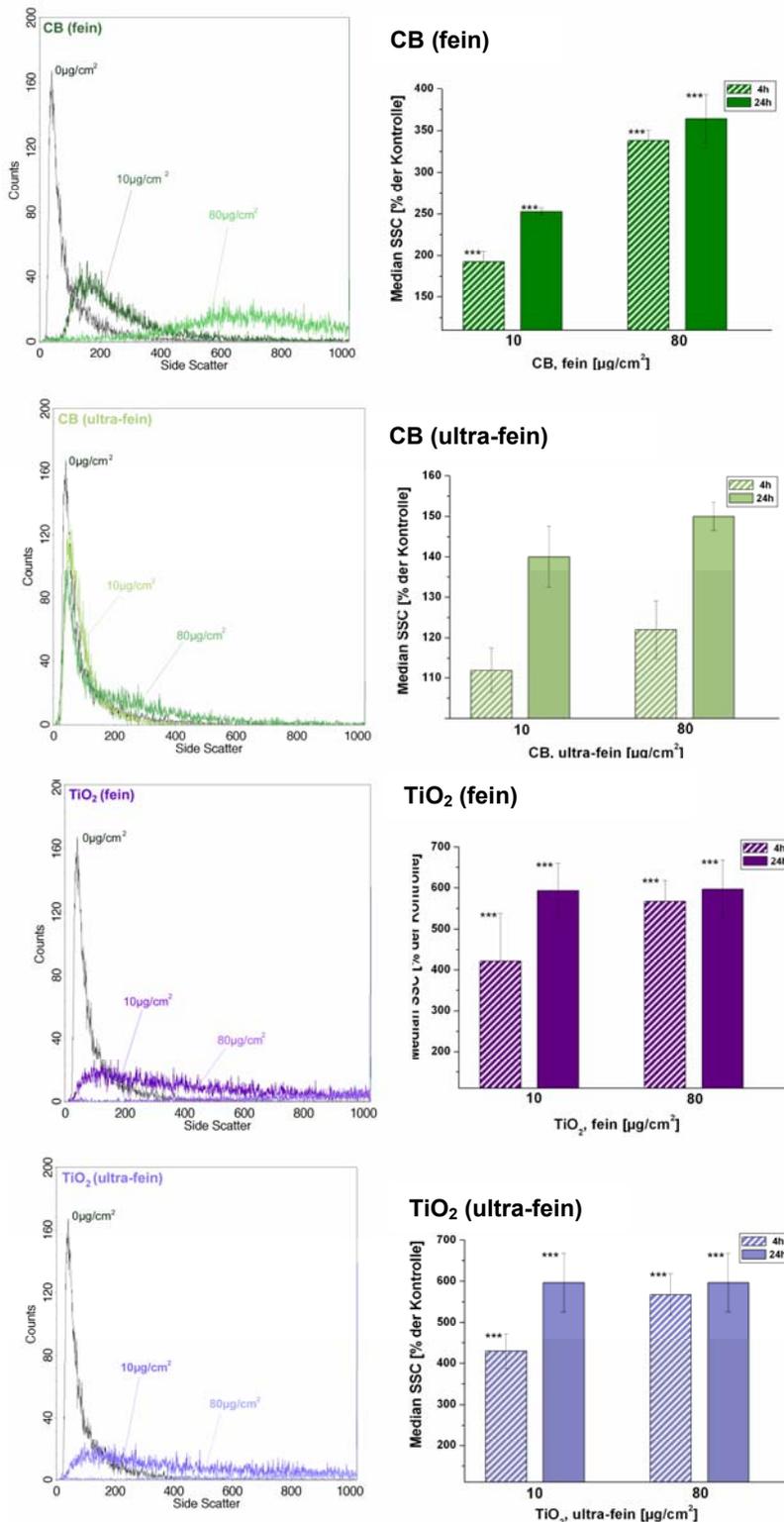
### 3.1.2.3 Messungen der Partikelaufnahme unterschiedlicher Partikel

DQ12, CB und TiO<sub>2</sub> weisen unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften, sowie unterschiedliche Größen (fein und ultra-fein) auf. Die Auswirkungen dieser unterschiedlichen Partikelcharakteristika auf die Partikelaufnahme, wurden durch die Belastung von NR8383 Zellen über 4 und 24h mit Dosen von 10 oder 80µg/cm<sup>2</sup> untersucht (*Abb. 3.1.2.3.1*). In den univariaten SSC-Overlays (gated) der 4h-Belastung ist, wie beim DQ12, eine Verschiebung der Maxima der Granularitätsverteilungen zu höheren SSC-Signalen mit steigender Partikeldosis zu verfolgen, die sich jedoch im Ausmaß von Partikel zu Partikel unterscheidet. Der ermittelte Median SSC zeigt einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg der Granularität, der bei allen Partikeltypen (ausgeschlossen ultra-feines CB), sowie jeder Belastungszeit und –dosis signifikant ist. Die Erhöhung des SSC-Signals zur Kontrolle ist jedoch für die verschiedenen Partikel unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Belastung mit feinem CB bewirkt eine ähnliche Erhöhung des Median SSC wie DQ12 (*Abb. 3.1.2.1.2*), wohingegen die mit ultra-feinem CB nur zu einer sehr geringen Verschiebung des Median SSC führt. Bei der Belastung mit TiO<sub>2</sub> Partikeln beider Größen steigt das SSC-Signal so stark an, dass nach langer (24h) und hoher (80µg/cm<sup>2</sup>) Belastung die Grenzen des Messbereichs des Durchflusszytometers erreicht werden. Deshalb und auf Grund der zelltoxischen Wirkung der hohen Dosis, wurde in der folgenden mechanistischen Untersuchung der TiO<sub>2</sub>- und CB-Aufnahme nur eine Dosis von 10µg/cm<sup>2</sup>, bei einer Belastungszeit von 4h untersucht. Der Mechanismus der DQ12-Aufnahme dagegen wurde unter Nutzung der geringen (10µg/cm<sup>2</sup>) und der höchsten nichttoxischen Dosis (40µg/cm<sup>2</sup>) analysiert, um mögliche dosisabhängige Unterschiede zu untersuchen (Xiao et al 2003).

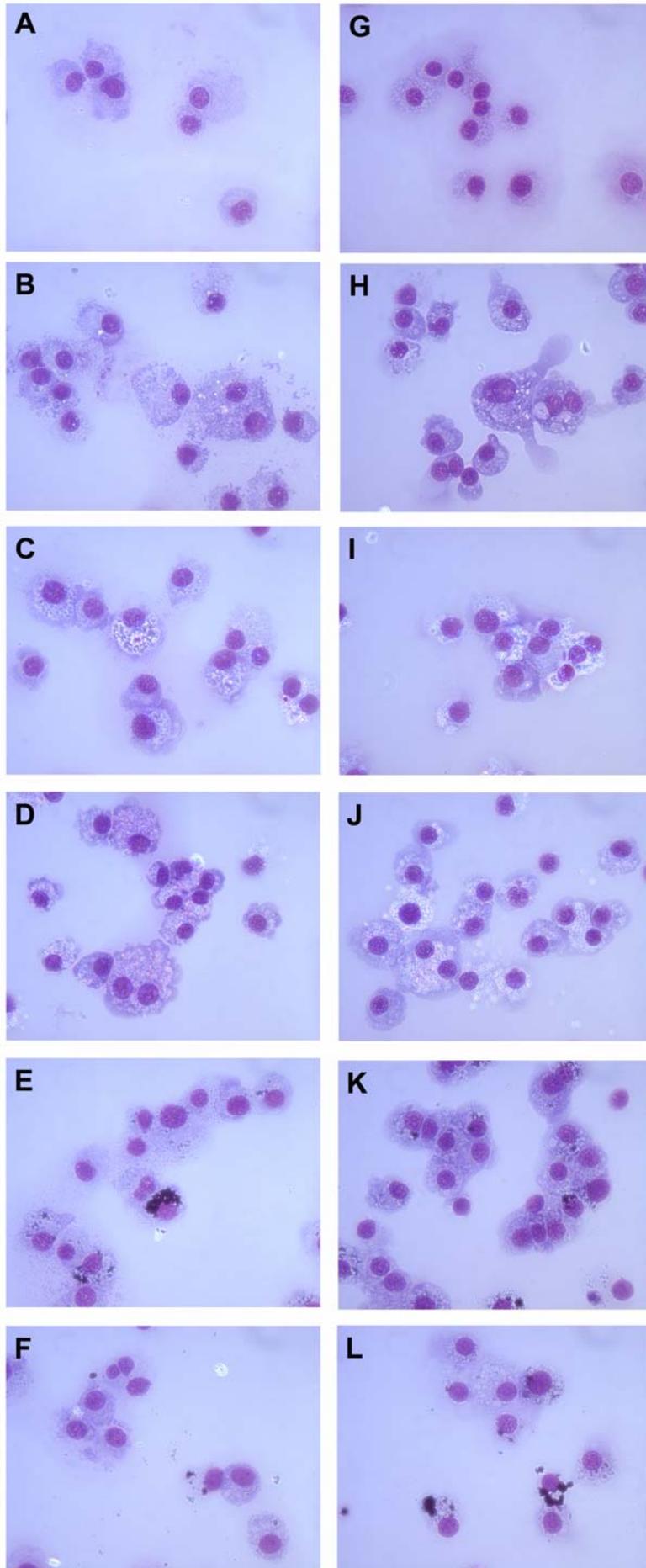
Die für die verschiedenen Partikelbelastungen ermittelten, unterschiedlich stark ausgeprägten Erhöhungen des SSC-Signals können jedoch nicht zum direkten Vergleich der aufgenommenen Partikelmenge herangezogen werden. Der SSC ist abhängig von der Komplexität der Zelle (Oberflächenstruktur, Granularität, Größe und Form; siehe Kapitel 2.2.5.1), die von den unterschiedlichen Partikeln, infolge ihrer verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften, anders beeinflusst werden kann. Die Erhöhung des SSC-Signals ist demnach zwar bei gleichem Partikeltyp steigender Konzentration ein Maß für eine dosisabhängige Aufnahme, kann aber nicht zum direkten quantitativen Vergleich der aufgenommenen Menge verschiedener Partikel eingesetzt werden.

Mikroskopische Beobachtungen der Partikelaufnahme (*Abb. 3.1.2.3.2*) an Zytospinpräparationen zeigen allerdings in NR8383 Zellen nach der Belastung mit CB (fein und ultra-fein), TiO<sub>2</sub> (fein und ultra-fein) und DQ12 über 4 und 24h bei einer Dosis von 10µg/cm<sup>2</sup> zur Durchflusszytometrie vergleichbare Ergebnisse. Während DQ12 (B, 4h; H, 24h) und feines CB (E, 4h; K, 24h) in ähnlichem Maß von den Zellen aufgenommen werden, ist ultra-feines CB nach 4h (F) in nahezu keiner und nach 24h (L) in nur wenigen Zellen zu

finden.  $\text{TiO}_2$  beider Größen dagegen wird nach beiden Belastungszeiten (4h, C, fein, D, ultra-fein; 24h, I, fein; J, ultra-fein) so stark aufgenommen, dass die gesamten Zellvolumina von Partikeln ausgefüllt zu sein scheinen. Die Kombination der durchflusszytometrischen Messergebnisse mit den Ergebnissen der Mikroskopie zeigen eine unterschiedliche Aufnahmekapazität verschiedener Partikel in NR8383 Zellen, mit: **CB (ultra-fein)  $\ll$  CB (fein) =  $\text{DQ12} \ll \text{TiO}_2$  (fein) =  $\text{TiO}_2$  (ultra-fein).**



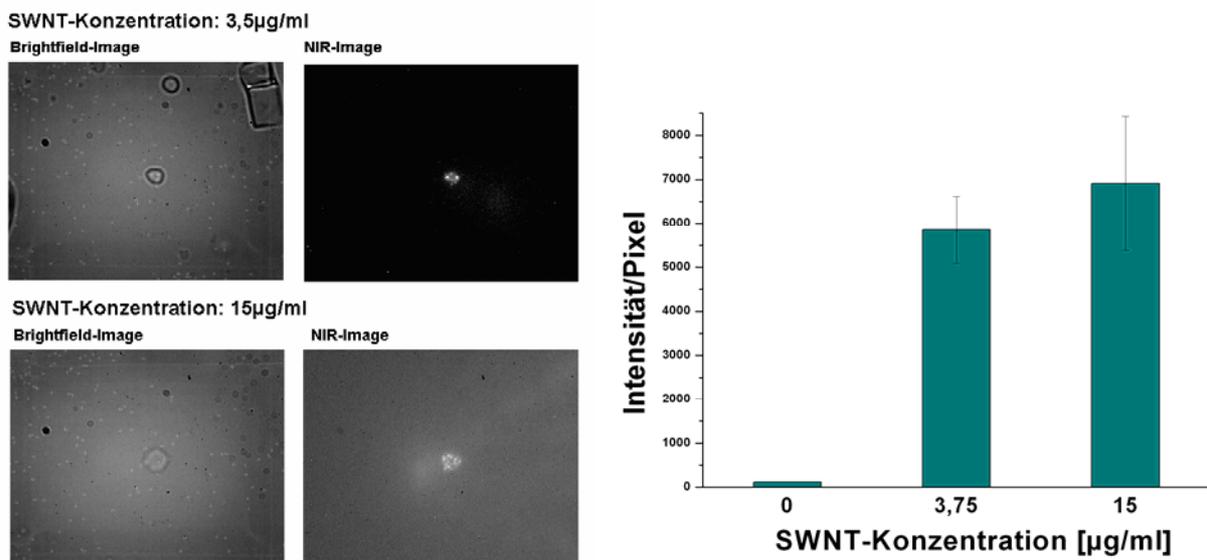
**Abb. 3.1.2.3.1:** Repräsentative univariante SSC (Side-Scatter-Angle)-Overlays (gated, linke Spalte) von unbelasteten (Kontrolle,  $0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und 4h mit verschiedenen Partikeln (CB, fein und ultra-fein;  $\text{TiO}_2$ , fein und ultra-fein; 10 und  $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) belasteter NR8383 Zellen. Der Median SSC (Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv 100\%$ )  $\pm$  SEM;  $n=3$ ; \*  $\equiv p<0,05$ , \*\*  $\equiv p<0,01$ , \*\*\*  $\equiv p<0,001$ ; rechte Spalte; Varianzanalyse, 95% Konfidenzintervall) steigt durch die Belastung mit CB (fein und ultra-fein) und  $\text{TiO}_2$  (fein und ultra-fein,) nach beiden Belastungszeiten (4 und 24h) und -dosen (10 und  $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) an.



**Abb. 3.1.2.3.2:** Repräsentative mikroskopische Phasen-Kontrast-Aufnahmen (n=3, originale Vergrößerung: x 1000) MGG (May-Giemsa-Grünwald) gefärbter Zytospinpräparationen unbelasteter (Kontrolle A, G) und belasteter NR8383 Zellen (Dosis: 10µg/cm<sup>2</sup> Belastungszeit: 4 (linke Spalte) und 24h (rechte Spalte) mit unterschiedlichen Partikeln: DQ12 [B, H]; feines [C, I]; wie ultra-feines [D, J] Titandioxid (TiO<sub>2</sub>); feines [E, K] wie ultra-feines [F, L] Carbon-Black (CB)).

### 3.1.2.4 Messungen der Aufnahme von SWNT's

Die Aufnahme von SWNT's kann nicht mit herkömmlichen Methoden untersucht werden. Infolge ihrer geringen Größenausdehnung -1µm Länge, bei nur 1nm durchschnittlichen Durchmesser- und ihres schwachen Kontrastes sind sie z.B. nicht elektronenmikroskopisch aufzulösen (Cherukuri et al. 2004). Die SWNT-Aufnahme ist ebenfalls nicht durchflusszytometrisch zu erfassen, wie Vorversuche mit NR8383 Zellen zeigen konnten. Eine 24h Exposition der Makrophagen zu verschiedenen SWNT-Konzentrationen hatte keinerlei Einfluss auf den Median SSC. SWNT's emittieren jedoch nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 660nm durch kovalent gebundene Fluorophore im nahinfraroten (NIR, 1125-1600nm) Wellenlängenbereich. Diese Eigenschaft konnte genutzt werden, um in einer Einzelzellanalyse die SWNT-Aufnahme durch die Messung der Fluoreszenz an Zytospinpräparationen von NR8383 Zellen nach der Belastung mit SWNT's (1h; 3,75 und 15 µg/ml) zu untersuchen. Eine lichtmikroskopische Untersuchung (Brightfield) lieferte zunächst Informationen über Lage und Ausbreitung der anschließend im NIR analysierten Zellen (Abb.3.1.2.4.2, links). Im NIR wurden dann, die von zellular aufgenommenen SWNT's erzeugten, hellen Spots zur Quantifizierung der SWNT Inkorporation genutzt, indem abschließend ein Infrarotspektren erstellt wurde. Aus diesen konnte die Fluoreszenzintensitäten als Maß für die Partikelaufnahme ermittelt werden. Die Mittelwerte der von je 25 Zellen gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in *Abb. 3.1.2.4.1, rechts* zusammengefasst. Die mittlere Fluoreszenzintensität von 120 Einheiten der Kontrolle erhöht sich nach 1h Belastung bei verschiedenen SWNT-Konzentrationen (3,75 und 15 µg/ml) auf Fluoreszenzintensitäten von 6000-7000 Einheiten. Die Ergebnisse zeigen, dass eine SWNT-Aufnahme stattgefunden hat, wobei jedoch keine Dosisabhängigkeit zu beobachten ist.

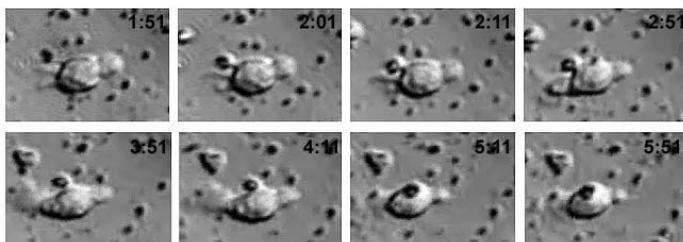
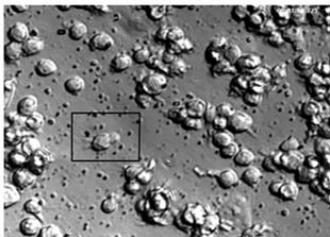


**Abb. 3.1.2.4.1:** Repräsentative Brightfield- und Infrarot-Aufnahmen SWNT belasteter NR8383 Zellen (links, 1h, 3,5µg/ml, oben; 15µg/ml, unten). Emittierte Fluoreszenz (Intensitäten/Pixel, Mittelwert ± SEM, von je 25 Zellen, rechts) unbelasteter und SWNT-belasteter NR8383. Die Aufnahmen sowie die Messergebnisse wurden von Tonya Leeuw unter Leitung von Prof. Bruce Weisman an der RICE-University, Houston, TX, USA zur Verfügung gestellt.

### 3.2 Rolle des Aktinzytoskeletts bei der Partikelaufnahme in Makrophagen

Für die Partikelaufnahme durch Makrophagen können verschiedene Mechanismen (klassische Phagozytose, rezeptorvermittelte Endozytose, Kapitel 1.3) verantwortlich sein. Dabei wird der Mechanismus z.B. von der Größe bestimmt. Die Größe von DQ12 ( $\text{Ø} = 0,96\mu\text{m}$ ) legt einen Aufnahmemechanismus über klassische Phagozytose (Aufnahme von Partikeln mit einem  $\text{Ø} > 0,5\mu\text{m}$ ) nahe. Für die anderen Partikel ist ein solcher Aufnahmemechanismus, aufgrund der geringeren Größen der feinen (CB(fein)- $\text{Ø} = 0,260\mu\text{m}$ ,  $\text{TiO}_2(\text{fein})\text{-Ø} = 0,260\mu\text{m}$ ), vor allem aber auch der ultrafeinen (CB(ultra-fein)- $\text{Ø} = 0,014\mu\text{m}$ ,  $\text{TiO}_2(\text{ultra-fein})\text{-Ø} = 0,025\mu\text{m}$ ) Partikel eher nicht zu erwarten.

Die Aufnahmemechanismen lassen sich dynamisch unterscheiden. Während die rezeptorvermittelte Endozytose eher ein passiver Prozess ist, bei dem die membrangebundenen Substanzen durch Membranstülpung in die Zelle aufgenommen werden, handelt es sich bei der klassischen Phagozytose um einen aktiven Prozess. Unter Ausbildung von Pseudopodien werden Partikel gebunden, umschlungen und aufgenommen. Einen ersten Hinweis auf einen solchen dynamischen Prozess bei der Quarzaufnahme ergaben Aufnahmen einer zeitaufgelösten Mikroskopiestudie (Abb. 3.2.1).



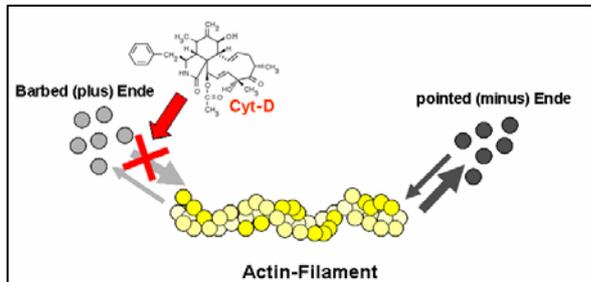
**Abb. 3.2.1:** Sequenzausschnitt aus einer zeitaufgelösten mikroskopischen Studie der DQ12-Aufnahme in NR8383 Zellen nach Belastung mit einer Quarzkonzentration von  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Die Aufnahmen stammen aus einer 30min Zeitsequenz, welche bei einer 40 fachen Vergrößerung mit 6 Bildern/min erstellt wurde. (Erstellt in Zusammenarbeit mit Herrn Erich Bünemann, Abteilung Dermatologie der Universitätsklinik Düsseldorf).

In den Ausschnitten ist die Aufnahme von DQ12 ( $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) über einen Zeitraum von 4min zu verfolgen. Die NR8383 Zelle bildet innerhalb der ersten 20s Pseudopodien zum DQ12-Partikel aus, umschlingt diesen und nimmt ihn innerhalb der nächsten 2min auf.

Die Hypothese der Partikelphagozytose soll im Folgenden an den verschiedenen Partikeln durch die Inhibition des Aktinzytoskeletts mittels Cyt-D sowohl durchflusszytometrisch als auch immunohistochemisch untersucht werden.

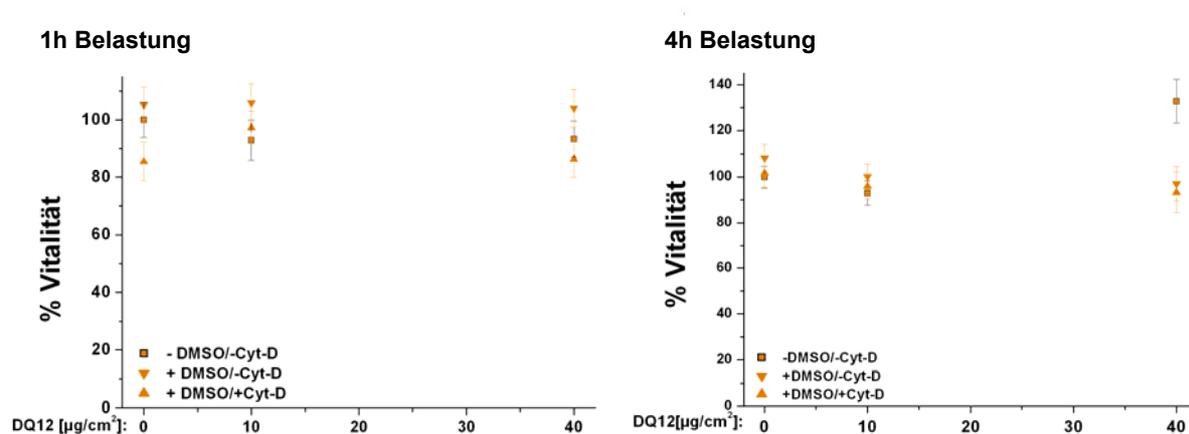
### 3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der Partikelaufnahme nach Aktininhibition

Das zur Untersuchung der Aktinbeteiligung an der Partikelaufnahme eingesetzte Cyt-D, ein zellpermeables Pilztoxin, inhibiert die Poly- und Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts, indem es an das barbed-(Plus)-Ende der Aktin-Filamente bindet (Abb. 3.2.2). Dadurch wird die, für die Phagozytose nötige Rekrutierung des Aktinzytoskeletts, verhindert.



**Abb. 3.2.2:** Schematische Darstellung der inhibitorischen Wirkung von Cytochalasin-D (Cyt-D) auf das Aktinzytoskelett. (verändert aus Heppler 2000).

Die zunächst an der DQ12-Aufnahme untersuchte Beteiligung des Aktinzytoskeletts erfolgte unter nicht toxischen Bedingungen (Abb. 3.2.1.1). Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen, dass weder die zusätzliche Inkubation mit Cyt-D (1,5µg/ml, 30min Vorinkubation) oder dem Cyt-D-Lösungsmittel DMSO (0,75%, 30min Vorinkubation) noch die anschließende DQ12-Belastung (1h oder 4h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) einen Einfluss auf die Vitalität der NR8383 Zellen haben.

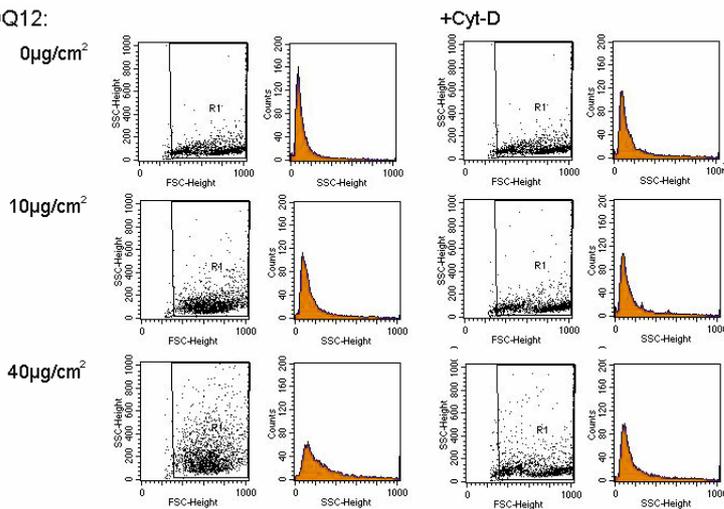


**Abb. 3.2.1.1:** Mittels MTT-Assays bestimmte Vitalität (Mittelwert ± SEM, n=3, student-t-test) von NR8383 Zellen nach einer DQ12-Belastung (10 und 40µg/cm<sup>2</sup>) über 1h und 4h ohne und unter Vorinkubation mit dem Aktininhibitor (1,5µg/ml Cyt-D, 30min) oder dem Inhibitorlösungsmittel (0,75% DMSO, 30min).

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Quarzaufnahme erfolgte, wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.2.3.3). durch die Messung des Median SSC. Die bivarianten SSC-FSC- und univarianten SSC-Histogramme (gated, Abb. 3.2.1.2) zeigen die Granularitätsverteilung der NR8383 Zellen ohne (links) und unter Aktininhibition (1,5µg/ml Cyt-D, 30min Vorinkubation, rechts) gefolgt von einer 1h DQ12-Belastung (10 und 40µg/cm<sup>2</sup>). In den Histogrammen nicht inhibierter Zellen, ist mit steigender Quarzkonzentrationen die DQ12-Aufnahme anhand der Zunahme der Anzahl von Zellen höherer Granularität (SSC) zu verfolgen. Die Histogramme der Messung nach Aktininhibition

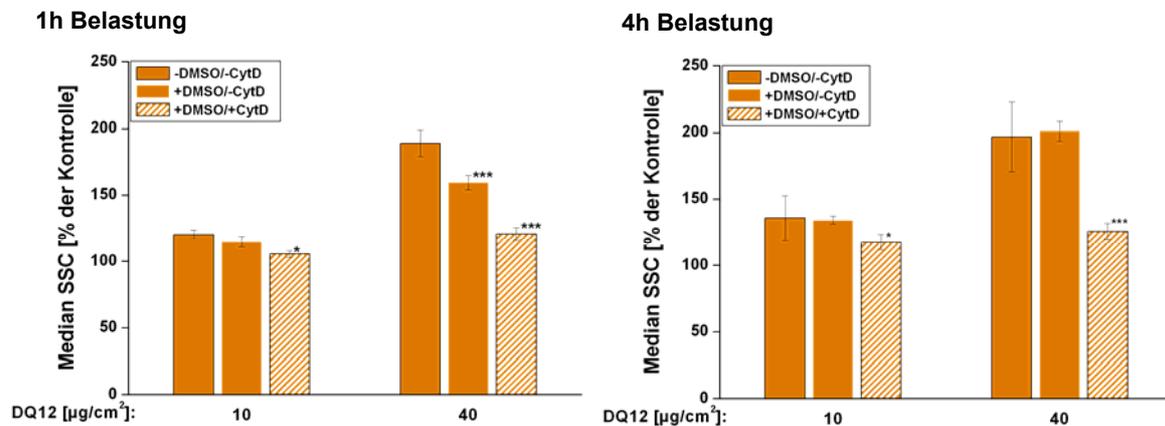
zeigen diese Veränderungen nicht. Die Anzahl der Signale im oberen Quadranten der bivarianten SSC-FSC-Histogramme erhöht sich nur geringfügig und auch in den univarianten SSC-Histogrammen ist nur eine geringe Veränderung der Granularitätsverteilung zu beobachten. Das Maximum der Zellgranularitätsverteilung verbreitert sich mit steigender DQ12-Dosis nur geringfügig und eine Verschiebung zu höheren Werten kann nahezu gar nicht beobachtet werden, was einer verminderten Partikelaufnahme infolge der Aktininhibition zuzuschreiben ist.

DQ12:



**Abb. 3.2.1.2:** Repräsentative bivariate SSC/FSC-(side-scatter- / forward-scatter-angle)-Histogramme und univarianten SSC-(side-scatter-angle)-Histogramme (gated) unbelasteter und 1h DQ12-belasteter (10, 40µg/cm<sup>2</sup>) NR8383 Zellen ohne (links) und unter Aktininhibition mit Cyt-D (rechts).

Der aus den univarianten SSC-Histogrammen (gated) für die Veränderung der Granularitätsverteilungen durch die DQ12-Aufnahme ermittelte Median SSC ist in Abb. 3.2.1.3 für eine 1h (links)- sowie 4h (rechts)-Belastung (10 und 40µg/cm<sup>2</sup>) zusammengefasst.

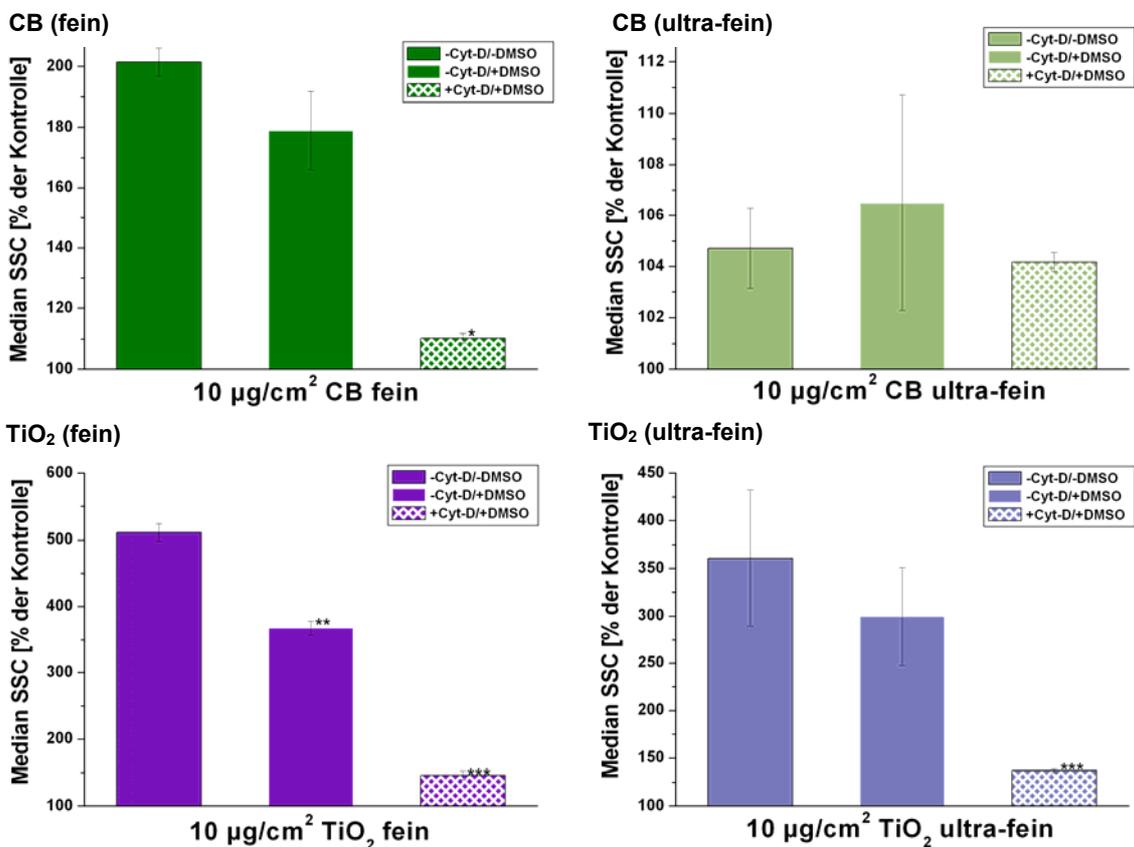


**Abb. 3.2.1.3:** Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert als % der Kontrolle (≡ 100%) ± SEM, n=3, \* ≡ p<0,05, \*\*\*≡ p<0,001; Varianzanalyse, 95% Konfidenzintervall) durch die Belastung mit DQ12 (10, 40µg/cm<sup>2</sup>) über 1 oder 4h ohne sowie nach Vorinkubation (30min) mit Cyt-D (1,5µg/ml) oder DMSO (0,75%).

Die Aktininhibition führte nach beiden Belastungszeiten, sowohl bei der geringen als auch bei der hohen DQ12 Dosis, zu einer signifikanten Verminderung des Median SSC, respektive zu einer Unterdrückung der Partikelaufnahme. Die DQ12-Aufnahme wird dabei durch Cyt-D so stark herabgesetzt, dass z.B. nach Belastung mit der hohen Dosis zu beiden Zeitpunkten eine Reduktion um den Faktor 4 erreicht wird. Eine vollständige Inhibition konnte jedoch

nicht erzielt werden. Mit Ausnahme der 1h Belastung mit geringer Dosis, ist nach der Aktininhibition noch eine Erhöhung des SSC-Signals um etwa 20% relativ zur Kontrolle zu beobachten. Hierbei könnte es sich um Partikel handeln, die an der Zelloberfläche anheften aber nicht aufgenommen wurden, da Cyt-D nur die Aktin-vermittelte Aufnahme nicht aber die Partikelbindung an der Zelloberfläche inhibiert. Durchflusszytometrisch kann zwischen diesen nicht differenziert werden, sodass zelloberflächengebundene und aufgenommene Partikel zur gleichen Erhöhung des Median SSC führen (Stringer et al 1996). DMSO, das Cyt-D-Lösungsmittel, beeinflusst -ausgenommen bei der 1h Belastung mit der hohen Dosis- die Partikel Aufnahme nicht. Nur nach der Inkubation mit DMSO, gefolgt von der DQ12-Belastung ( $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), wird die nach 1h gemessene Partikel Aufnahme ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß als durch Cyt-D, signifikant gesenkt.

Im Weiteren sollte nun untersucht werden, ob auch die Aufnahme anderer Partikel (CB und  $\text{TiO}_2$ , fein und ultra-fein) wie die DQ12 Aufnahme Aktin-vermittelt erfolgt. Die Vorinkubation der NR8383 Zellen mit Cyt-D ( $1,5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30min) führte - mit Ausnahme von ultra-feinem CB, bei dem bereits keine signifikante Aufnahme gezeigt werden konnte- nach einer 4h Belastung mit einer Partikeldosis von  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zu einer signifikant Inhibition der Aufnahme aller Partikel (Abb. 3.2.1.4).



**Abb. 3.2.1.4:** Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv 100\%$ )  $\pm$  SEM;  $n=3$ ; \*  $\equiv p<0,05$ , \*\*  $\equiv p<0,01$ , \*\*\* $\equiv p<0,001$ ; Varianzanalyse, 95% Konfidenzintervall) nach Belastung ( $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 4h) mit feinem sowie ultra-feinem Carbon Black (CB)- und  $\text{TiO}_2$ -Partikeln ohne oder nach Vorinkubation mit Cyt-D ( $1,5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30min) oder DMSO ( $0,75\%$ , 30min).

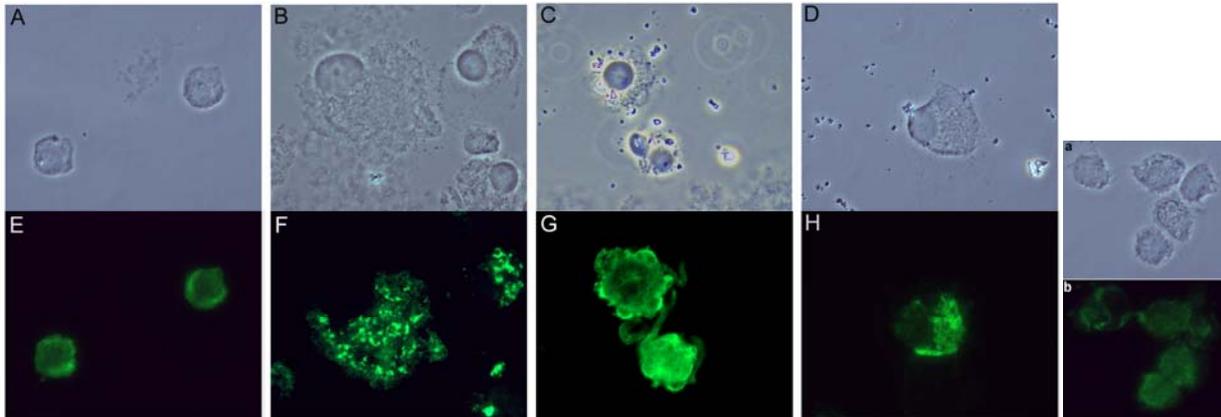
Die Aktininhibition führte bei der Belastung mit feinen CB-Partikeln sowie mit feinen und ultra-feinen TiO<sub>2</sub>-Partikeln zu einer Verminderung des auf die Kontrolle normierten Median SSC um einen Faktor 10. Eine vollständige Inhibition konnte jedoch auch bei der Aufnahme dieser Partikel nicht erreicht werden, da sich auch nach Aktininhibition das SSC-Signal durch potentielle zelloberflächengebundene Partikel bei CB (fein) um etwa 10%, bei TiO<sub>2</sub> (fein) um etwa 40% und bei TiO<sub>2</sub> (ultra-fein) um etwa 25% relativ zur Kontrolle erhöhte. DMSO beeinflusst die Partikelaufnahme nur im Falle der Belastung mit feinem TiO<sub>2</sub> signifikant.

Die Hemmung der Aktinkomponente des Zytoskeletts bewirkte die Reduktion der, durch die Aufnahme von DQ12, CB (fein), TiO<sub>2</sub> (fein) und TiO<sub>2</sub> (ultra-fein) verursachten, durchflusszytometrisch gemessene Granularitätserhöhung auf den vermutlich von zelloberflächengebundenen Partikeln verursachten Anstieg. Somit sollte der Aufnahme dieser Partikel ein klassischer Phagozytosemechanismus zugrunde liegen.

### **3.2.2 Immunohistochemische Untersuchung des Aktinzytoskeletts während der Partikelaufnahme**

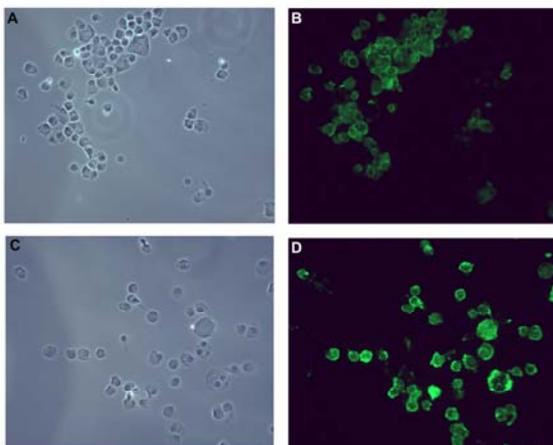
Die Spezifizierung der Zytoskelettbeteiligung erfolgte am Beispiel DQ12 durch eine immunohistochemische Untersuchung der Aktinstrukturierung während der Partikelaufnahme. Aus Vorversuchen ergab sich für die Immunohistochemie mit 488-Phalloidin, ein aktinbindendes Pilzgift, aus der Belastung von NR8383 Zellen mit einer Quarzdosis von 10µg/cm<sup>2</sup> über 7,5 wie 15, 30 und 60min eine ideale Expositionszeit von 15min. Zu diesem Belastungszeitpunkt konnten die stärksten Aktinskelettmstrukturierungen verfolgt werden (*Abb. 3.2.2.1*). Eine erste auffällige Veränderung ließ sich in der Erhöhung der Fluoreszenzintensität verfolgen, die sowohl nach der Partikelbelastung (G) als auch nach Aktininhibition mit Cyt-D (1,5µg/ml, 30min, F, H) zu beobachten ist und bereits von Brown et al. 2005 für die Aufnahme von PM<sub>10</sub> beschrieben wurde. Dies ist zum einen durch die Aktinrekrutierung zur Partikelbindungsstelle sowie durch die Clusterung der Aktin-Filamente infolge der Cyt-D Wirkung zu erklären. In beiden Prozessen wird die Dichte des Aktins an verschiedenen Stellen in der Zelle erhöht, was zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals führt. Des Weiteren lässt sich die Rekrutierung des Aktinzytoskeletts während der Phagozytose verfolgen. Die abgebildeten Zellen der Kontrolle (A, E) zeigen eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Zelle, was auf eine relativ gleichmäßig aufgebaute F-Aktinstruktur innerhalb der Zelle zurückzuführen ist. Durch die Belastung mit DQ12 (C, G) wird die Phagozytose eingeleitet, indem das Aktinzytoskelett zu den Partikelbindungsstellen rekrutiert wird. Ebenso ist die Kondensation des F-Aktins in den die Partikel umfließenden Pseudopodien zu beobachten. Dagegen zeigen die Fluoreszenzaufnahmen nach Cyt-D Inkubation (B, F, D, H) traubenförmige Zusammenschlüsse des F-Aktins. Die Rekrutierung des Zytoskeletts oder eine Aufnahme von DQ12-Partikeln nach der Belastung (D, H) sind

nicht mehr zu verfolgen. Die Abbildung DMSO behandelter Zellen (a, b) zeigen, dass das Cyt-D-Lösungsmittel DMSO alleine keinen Einfluss auf die Aktinstruktur hat. Die Immunohistochemie konnte somit eine klassische Phagozytose als den für die Aufnahme von DQ12-Partikeln verantwortlichen Mechanismus bestätigen.



**Abb. 3.2.2.1:** Repräsentative Abbildungen (n=4, original Vergrößerung: x 1000) mikroskopischer Phasen-Kontrast (obere Reihe)- und Fluoreszenz (488nm, untere Reihe)-Aufnahmen 488-Phalloidin gefärbter Zytospinpräparationen unbelasteter (A, E, B, F, a, b) und 15min mit  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12 belasteter (C, D, G, H) NR8383 Zellen ohne (A, E, C, G) sowie nach Cyt-D ( $1,5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30min Vorinkubation; B, F, D, H) oder DMSO ( $0,75\%$ , 30min Vorinkubation; a, b) Inkubation.

SWNT's sind infolge ihrer optischen Eigenschaften nicht mikroskopisch aufzulösen (siehe auch Abb. 3.2.2.2, C Phasen-Kontrast-Aufnahme SWNT belasteter NR8383 Zellen). Somit ist die Rekrutierung des Zytoskeletts zu den Partikelbindungsstellen, mangels eines Bezugspunkts (gebundener Partikel), mikroskopisch nicht zu verfolgen. Allerdings ist die Erhöhung der Fluoreszenzintensität, infolge einer Veränderung der Aktindichte zu beobachten (Abb. 3.2.2.2). Im Vergleich zur Kontrolle (A, B) zeigen die Abbildungen der Fluoreszenzaufnahmen 488-Phalloidin gefärbter Zytospinpräparationen nach der Belastung mit SWNT's (1h,  $15\mu\text{g}/\text{ml}$ , C, D) eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Dies könnte auf eine, für die SWNT-Aufnahme benötigte Aktinrekrutierung zuzuführen sein, was einen ersten Hinweis auf einen Aktin-vermittelten Aufnahmemechanismus darstellt.



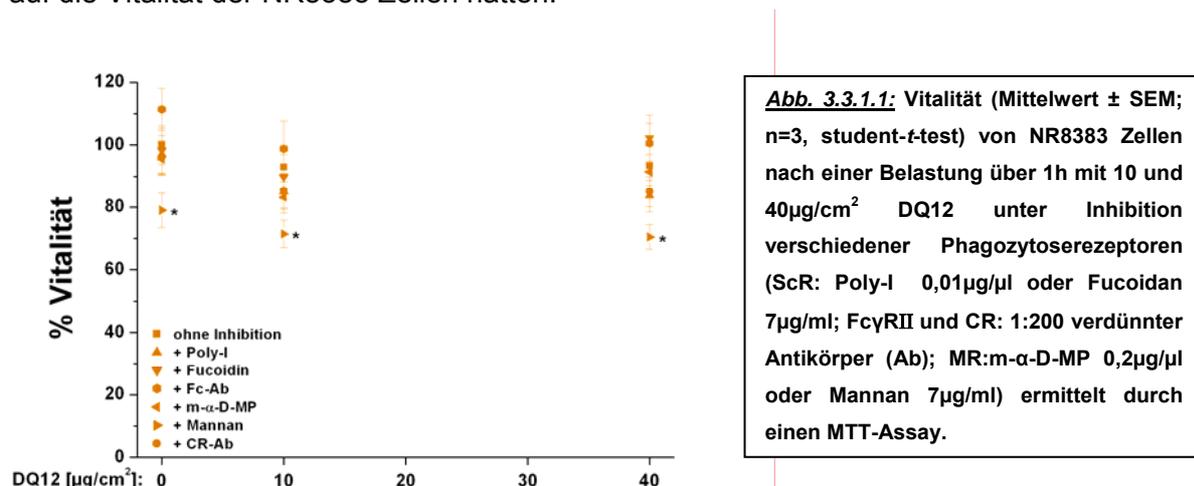
**Abb. 3.2.2.2:** Abbildungen mikroskopischer Phasen-Kontrast (links)- und Fluoreszenz (488nm, rechts)-Aufnahmen (original Vergrößerung: x 400) 488-Phalloidin gefärbter Zytospinpräparationen unbelasteter (A, B) und SWNT-belasteter (1h,  $15\mu\text{g}/\text{ml}$ ; C, D) NR8383 Zellen.

### 3.3 Die Rolle des FcγRII bei der Phagozytose von Partikeln in Makrophagen

Bei der Aufnahme von DQ12 handelt es sich um einen klassischen Phagozytoseprozess über die Rekrutierung des Aktinzytoskeletts. Dieser Prozess kann von verschiedensten klassischen Phagozytoserezeptoren wie CR, FcγRII, ScR oder MR mediiert sein (Aderem und Underhill 1999). Im Folgenden soll exemplarisch für die DQ12-Phagozytose der oder die beteiligte/n Rezeptor/en spezifiziert werden. Dies erfolgte zunächst durchflusszytometrisch unter Einsatz spezifischer Rezeptorinhibitoren und über eine Immunohistochemie.

#### 3.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der Partikelaufnahme nach Inhibition verschiedener klassischer Phagozytose-Rezeptoren

Zur Inhibierung der verschiedenen Phagozytoserezeptoren wurde entweder der spezifische Antikörper (blockierender Antikörper für CR, FcγRII) oder, falls dieser nicht verfügbar war, ein entsprechender Agonist (ScR: Poly-I oder Fucoidin, MR: Mannan oder m-α-D-MP) eingesetzt. Durchflusszytometrische Vorversuche zeigten, dass sich nach der 4h Belastung, verursacht durch die Instabilität der Inhibitoren (O'Brien et al 2003), die DQ12 Aufnahme nicht signifikant reduzieren ließ, sodass im Gegensatz zur Aktininhibition nur die Inhibition nach 1h Belastung untersucht werden konnte. Dabei erfolgte die Inhibition aller Rezeptoren zur Untersuchung ihrer potentiellen Beteiligung an der Partikelaufnahme unter nicht zelltoxischen Bedingungen (Abb. 3.3.1.1). Ein MTT-Assay zeigte, dass alle Inhibitoren - mit Ausnahme von Mannan, welches einen leichten zelltoxischen Effekte aufwies- sowie die darauf folgenden DQ12 Belastungen (1h, 10 und 40µg/cm<sup>2</sup>) keine signifikante Auswirkung auf die Vitalität der NR8383 Zellen hatten.

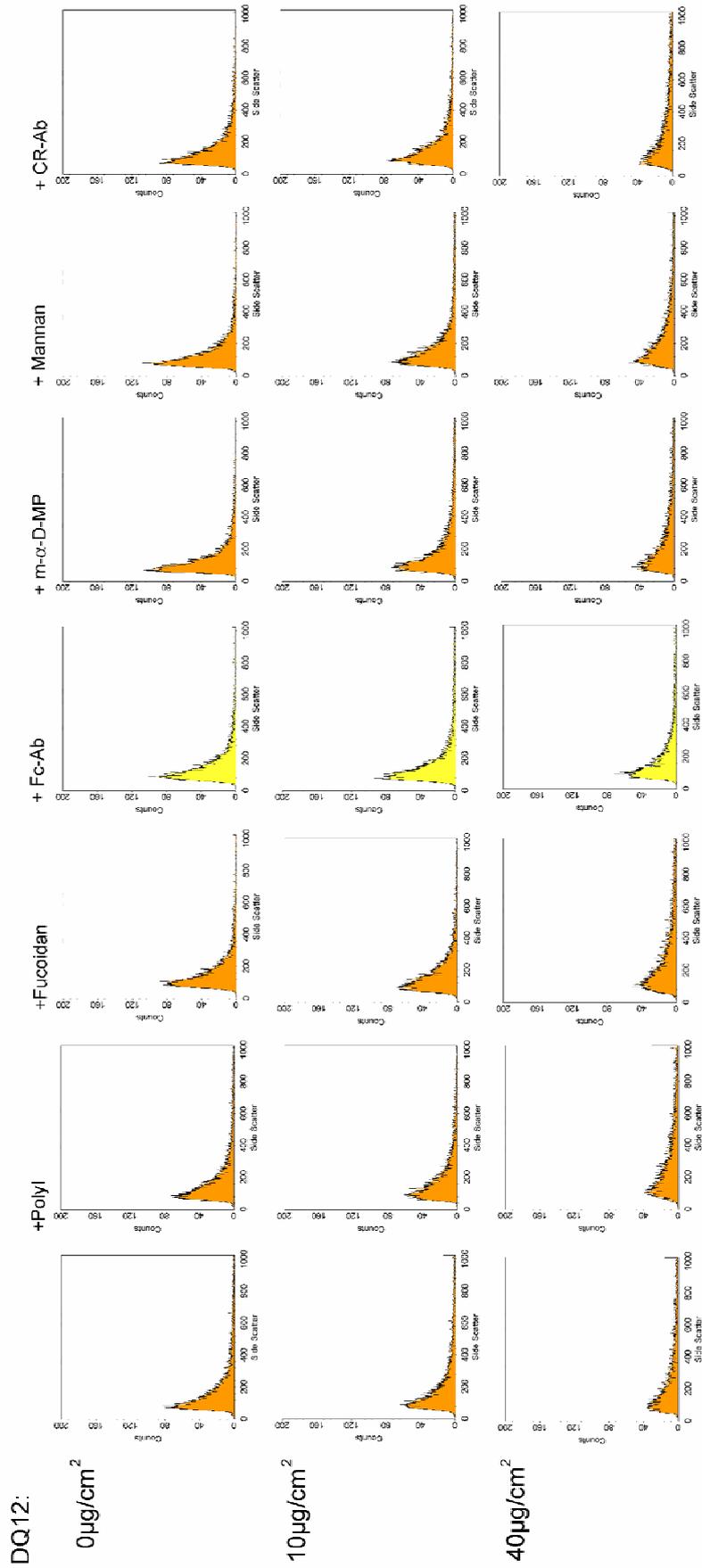


**Abb. 3.3.1.1:** Vitalität (Mittelwert ± SEM; n=3, student-t-test) von NR8383 Zellen nach einer Belastung über 1h mit 10 und 40µg/cm<sup>2</sup> DQ12 unter Inhibition verschiedener Phagozytoserezeptoren (ScR: Poly-I 0,01µg/µl oder Fucoidan 7µg/ml; FcγRII und CR: 1:200 verdünnter Antikörper (Ab); MR:m-α-D-MP 0,2µg/µl oder Mannan 7µg/ml) ermittelt durch einen MTT-Assay.

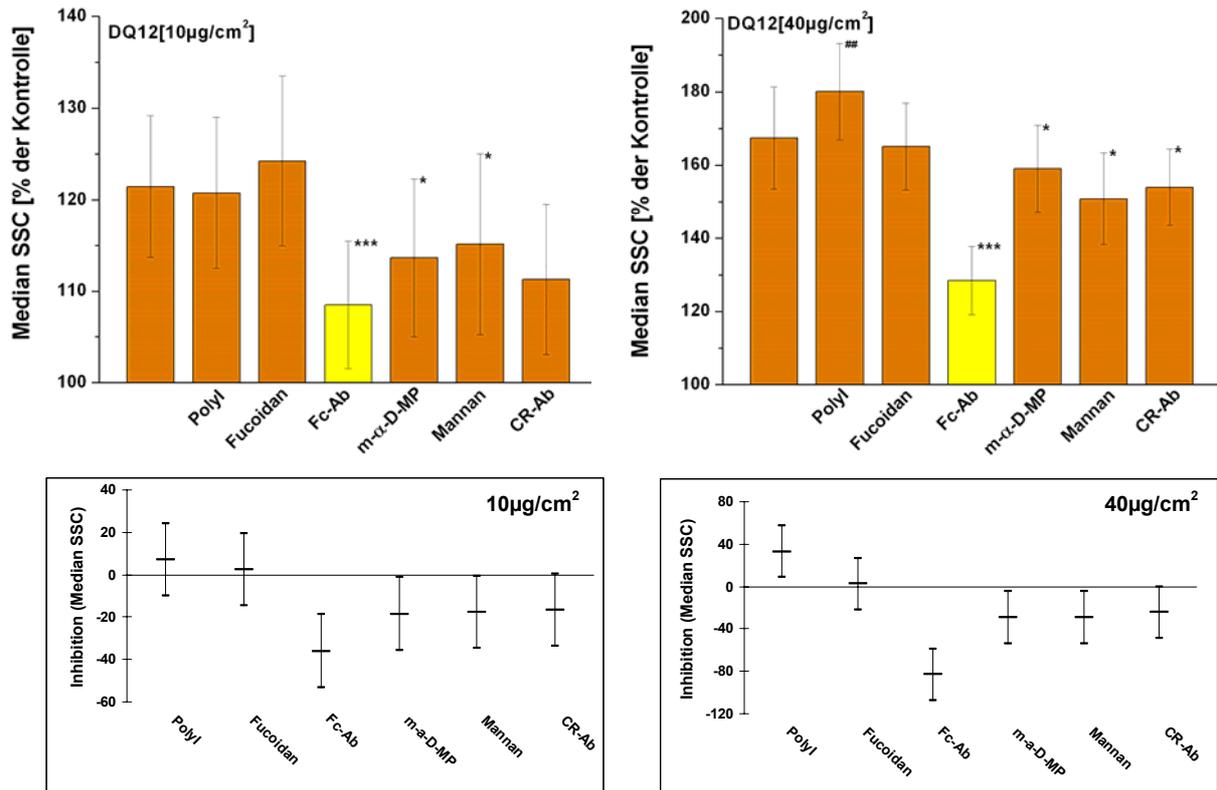
Die durchflusszytometrische Untersuchung der Quarzaufnahme durch NR8383 Zellen erfolgte wie zuvor durch die Messung des Median SSC unter Analyse von bivarianten SSC-FSC-Histogrammen und univarianten SSC-Histogrammen (gated). Repräsentative univariante Histogramme der SSC-Verteilungen von Zellen, ohne und nach Inhibition

verschiedener Phagozytoserezeptoren, gefolgt von einer 1h DQ12 Belastung (10, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), sind in *Abb. 3.3.1.2* zusammengefasst. In den univarianten SSC-Histogrammen nicht inhibierter Zellen (erste Spalte, links) kann nach der 1h Belastung die Quarzaufnahme anhand der Zunahme der Anzahl von Zellen höherer Granularität (SSC) mit steigenden Quarzkonzentrationen (10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), wie zuvor beschrieben, verfolgt werden. Die univarianten SSC-Histogramme rechts davon, zeigen die Veränderungen der Verteilung des SSC-Signals bei den unterschiedlichen DQ12-Dosen unter Inhibition der verschiedenen Phagozytoserezeptoren (ScR mit Poly-I oder Fucoidan, Fc $\gamma$ RII mit Fc $\gamma$ RII-Antikörper, MR mit m- $\alpha$ -D-MP oder Mannan und CR mit CR3-Antikörper). So sind nach Inhibition des ScR mit Poly-I oder Fucoidan, infolge der Belastung mit steigenden DQ12-Konzentrationen, gleiche Veränderungen der SSC-Maxima wie bei den nicht inhibierten Zellen zu verfolgen. Die Verbreiterung und Verschiebung der Granularitätsverteilung deutet auf eine unverminderte Partikelaufnahme hin. Nach der Inhibition des Fc $\gamma$ RII dagegen verändert sich die Granularitätsverteilung der Zellen nur geringfügig. Im Vergleich zu den unbelasteten Zellen lässt sich nach der 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Belastung nahezu keine und durch die Belastung mit 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nur eine leichte Verbreiterung und Verschiebung der SSC-Verteilungsmaxima feststellen, was auf eine reduzierte Partikelaufnahme hindeutet. Die nach der Inhibition des MR oder CR mit Mannan, M- $\alpha$ -D-MP oder dem CR-Antikörper aufgenommenen SSC-Histogramme deuten ebenfalls auf eine Reduktion der Partikelaufnahme hin. Die Verteilungen der SSC-Signale nach der DQ12-Belastung zeigen, im Vergleich zu den nicht inhibierten Zellen, eine geringere Verschiebung zu höheren Werten.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen, welche in *Abb. 3.3.1.3 (oben)* als Median des SSC in % der Kontrolle dargestellt sind, wie auch das Ergebnisse der Varianzanalyse, dargestellt als Inhibition des Median SSC (*Abb. 3.3.1.3, unten*), welche die Inhibition am besten darstellt, allerdings keine Betrachtung der Phagozytose rate zulässt, geben das genaue Inhibitionsmuster wieder. So führt die Inhibition des ScR mittels Poly-I oder Fucoidan bei der Belastung mit beiden DQ12 Konzentrationen zu keiner Verringerung des Median SSC. Die Phagozytose der Quarzpartikel konnte durch die Inhibition dieses Rezeptors nicht blockiert werden. Gegenteilig zeigt sich sogar, bei der höheren DQ12 Belastung nach Inhibition des ScR mit Poly-I eine signifikante Erhöhung der Phagozytosekapazität. Am erfolgreichsten konnte die Partikelaufnahme durch die Inhibition des Fc $\gamma$ RII mit dem Antikörper reduziert werden. Die Inhibition führte nach einer Belastung mit beiden Quarzkonzentrationen zu einer signifikanten Herabsetzung des Median SSC auf ein vergleichbares Niveau wie bei der Aktininhibition. Eine vollständige Inhibition konnte jedoch wieder nicht erreicht werden, sodass anzunehmen ist, dass immer noch Partikel von den Zellen unter einer möglichen Beteiligung anderer Phagozytoserezeptoren aufgenommen oder zumindest an der Zelloberfläche gebunden werden.



**Abb. 3.3.1.2:** Repräsentative univariante SSC-(side-scatter-angle)-Histogramme (gated) unbelasteter (1h, 10 oder 40µg/cm<sup>2</sup>) NR8383 Zellen ohne oder unter Inhibition klassischer Phagozytosezeptoren (SCR: Poly-I, 0,01µg/µl oder Fucoidan, 7µg/ml; 1:200 verdünnter FcR- oder CR- Ab sowie MR: M-α-D-MP, 0,2µg/µl oder Mannan, 7µg/ml).

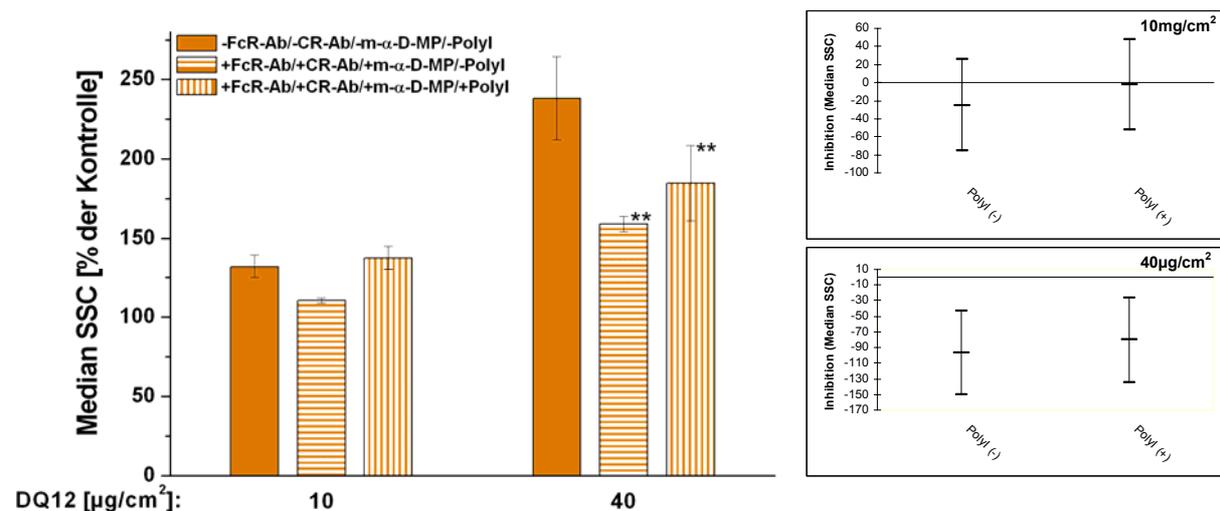


**Abb. 3.3.1.3:** Messung des Median SSC nach der Belastung von NR8383 Zellen mit DQ12 (1h; 10µg/cm<sup>2</sup> oben; 40µg/cm<sup>2</sup> unten) ohne und unter Inhibition des ScR (Poly-I, 0,01µg/µl; Fucoidan, 7µg/ml), FcγII<sub>R</sub>, CR3 (1:200 verdünnter FcγII<sub>R</sub>- oder CR3-Antikörper) sowie des MR (M-α-D-MP, 0,2µg/µl; 7µg/ml Mannan). Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle (≅ 100%) ± SEM; n=3; \* ≅ p<0,05, \*\*\*≅ p<0,001 signifikante Reduktion; ## ≅ p<0,01 signifikante Erhöhung, oben). Inhibition des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert ± Ober-/Untergrenze einer Varianzanalyse bei einem Konfidenzintervall von 95%, n=3, unten).

Die Quarzaufnahme scheint ebenfalls, wenn auch in geringem Maß über andere Rezeptoren ablaufen zu können, da auch die Inhibition des MR sowie des CR zu einer Verringerung des ermittelten Median SSC führte. So konnte die Partikel Aufnahme bei der hohen DQ12 Belastung durch die Inhibition des CR signifikant reduziert werden. Die Inhibition des MR durch Mannan oder m-α-D-MP führte sowohl bei der Belastung mit der geringen als auch mit der hohen DQ12-Dosis zu einer signifikanten Verringerung der Partikel Aufnahme.

Der FcγRII, dessen Inhibition die Partikelphagozytose am erfolgreichsten reduzieren konnte scheint hauptsächlich für die DQ12 Aufnahme verantwortlich zu sein. Allerdings kann auch die Beteiligung anderer Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden, sodass sich aus der Inhibitionsstudie folgende Inhibitoreffizienz ergibt: **Poly-I (ScR), Fucoidan (ScR) = Kontrolle < m-α-D-MP (MR), Mannan (MR) = CR-Antikörper (CR) << FcγRII-Antikörper (FcR)**

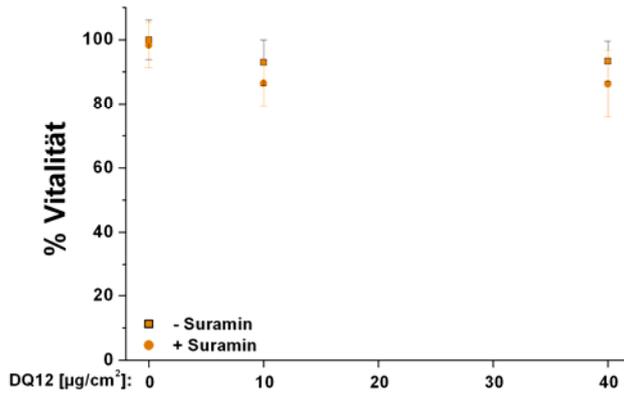
Durch die Inhibition eines einzelnen Rezeptors konnte keine vollständige Hemmung der DQ12-Phagozytose erzielt werden. Doch auch die Inkubation mit Kombinationen verschiedener Inhibitoren konnte die Phagozytose nicht vollständig reduzieren (Abb. 3.3.1.4).



**Abb. 3.3.1.4:** Messung des Median SSC an NR8383 Zellen ohne und unter Inkubation mit zwei Inhibitorenkombinationen (dreier Kombination aus: 1:200 verdünntem FcR- und CR-Antikörper sowie m-α-D-MP (0,2µg/µl); vierer Kombination aus: 1:200 verdünntem FcR- und CR-Antikörper, m-α-D-MP (0,2µg/µl) sowie Poly-I (0,01µg/µl) nach der DQ12-Belastung (1h; 10 und 40µg/cm²). Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle (≙ 100%) ± SEM; n=3; \*\*≙ p<0,01 signifikante Reduktion, *links*). Inhibition des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert ± Ober-/Untergrenze einer Varianzanalyse bei einem Konfidenzintervall von 95%, n=3, *rechts*).

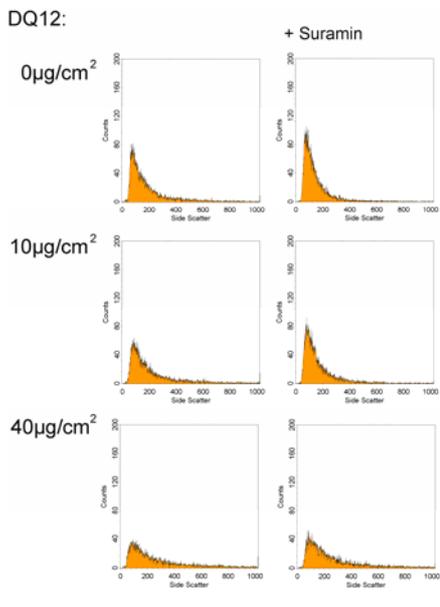
Beide Inhibitorkombinationen (eine aus dem FcγRII-, CR-Antikörper sowie m-α-D-MP und eine weitere, die zusätzlich Poly-I enthält) konnten die DQ12-Phagozytose bei der Belastung mit der hohen Dosis signifikant reduzieren. Dabei stellte sich nach der Inhibition mit der dreier Kombination (FcγRII-, CR- Antikörper und m-α-D-MP) eine gleichwertige Inhibition, wie sie auch durch die Hemmung des FcγRII oder des Zytoskeletts erzielt werden konnte, ein. Die im Gegensatz zur Aktininhibition erwartete, vollständige Unterbindung des Anstiegs des Median SSC konnte jedoch auch durch die kombinatorische Inhibition nicht erreicht werden. Die Zugabe von Poly-I bei der Inhibition mit der vierer Kombination (FcγRII-, CR-Antikörper, m-α-D-MP und Poly-I) scheint dagegen den Median SSC wieder zu erhöhen.

In einer Weiteren durchflusszytometrischen Inhibitorstudie wurde der Einfluss eines nicht Phagozytoserezeptors auf die DQ12-Aufnahme untersucht. Dabei wurden die beiden, von NR8383 Zellen expremierten P<sub>2</sub>-Purinrezeptoren, P2Y (G-Protein-gekoppelt) und P2X (ATP regulierter Ionenkanal), die mit der Regulierung der Phagozytose in Verbindung gebracht werden, durch den P<sub>2</sub>-Purinrezeptoragonist Suramin blockiert (Di Virgillio et al 2001, Bowler et al 2003). Dabei wurde die inhibitorische Wirkung des Suramins bei einer 1h DQ12-Belastung beider Dosen (10, 40 µg/cm²) unter nicht zelltoxischen Bedingungen (MTT-Assay, *Abb. 3.3.1.5*) untersucht.



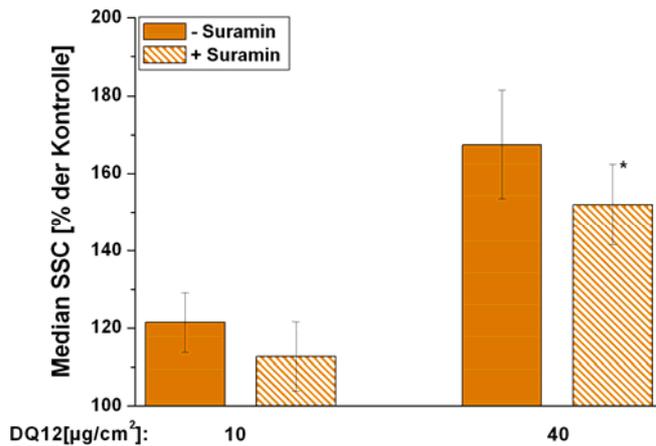
**Abb. 3.3.1.5:** MTT-Assay zur Bestimmung der Vitalität (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3; studen-t-test) unbelasteter sowie DQ12 belasteter (1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) NR8383 Zellen ohne oder unter Inhibition der P<sub>2</sub>-Purinrezeptor (P2X, P2Y) mit Suramin (10µg/ml).

Die zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Quarzaufnahme (1h DQ12; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) ohne (links) und nach Inhibition der P<sub>2</sub>-Purinrezeptoren mit Suramin (rechts) erstellten univariante SSC-Histogrammen (gated) sind in Abb. 3.3.1.6 zusammengefasst. Die univariante SSC-Histogramme der nicht inhibierten Zellen zeigen die bereits bekannte Quarzaufnahme bedingte Verschiebung der Granularitätsverteilung (SSC). In den univariante SSC-Histogrammen rechts davon, ist die verminderte Verbreiterung und Verschiebung der Granularitätsmaxima, nach der Belastung mit DQ12 beider Dosen, als Folge der Inhibition durch Suramin zu beobachten. Die Inhibition des P<sub>2</sub>-Purinrezeptors scheint die Phagozytosekapazität zu verringert.



**Abb. 3.3.1.6:** Repräsentative univariante SSC-(side-scatter-angle)-Histogramme (gated) unbelasteter und DQ12 (1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) belasteter NR8383 Zellen ohne (links) und nach der Inhibition mit Suramin (10µg/ml, rechts).

Die Inhibition führte bei der Belastung mit der hohen Quarzdosis (40µg/cm<sup>2</sup>) zu einer signifikanten Herabsetzung des Median SSC, wie die Ergebnisse der Messungen, die als Median des SSC in % der Kontrolle dargestellt sind (Abb. 3.3.1.7), zeigen. Die Stärke der Inhibition durch Suramin ist zwar, im Vergleich zu der durch den FcγRII-Antikörper bewirkten DQ12-Phagozytosenkung geringer, hat jedoch bei der niedrigen DQ12 Dosis eine ähnliche und bei der hohen sogar eine stärkere inhibitorische Wirkung als die Inhibitoren des MR oder CR.



**Abb. 3.3.1.7:** Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle ( $\approx 100\%$ )  $\pm$  SEM; n=3; \*  $\equiv$  p<0,05, signifikante Reduktion) nach DQ12-Belastung (1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) von NR8383 Zellen ohne und nach Inhibition der P<sub>2</sub>-Purinrezeptoren mit Suramin (1µg/ml).

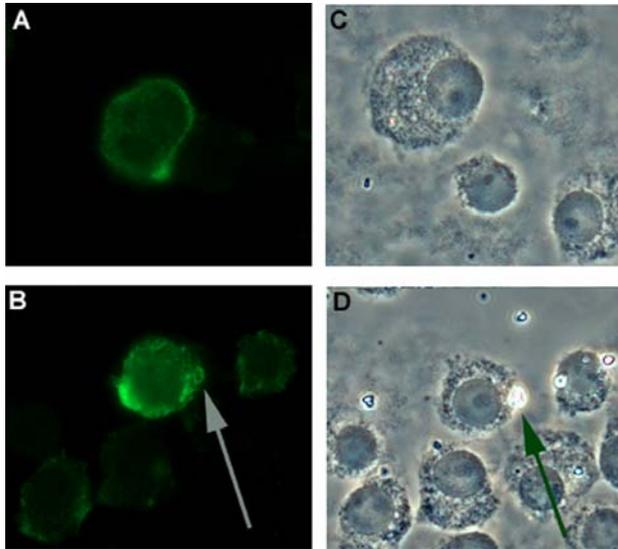
Da die inhibitorische Wirkung des Suramin bereits in neutrophilen Granulozyten für die Aufnahme IgG opsonierter Hefepartikel gezeigt werden konnte (Zalavary et al. 1996), ist der Effekt auf die Phagozytoserate ebenfalls ein Indiz für einen DQ12-Aufnahmemechanismus über eine IgG abhängige FcγRII-Phagozytose.

### 3.3.2 Immunohistochemische Untersuchung möglicher an der Partikelaufnahme beteiligter Phagozytose-Rezeptoren

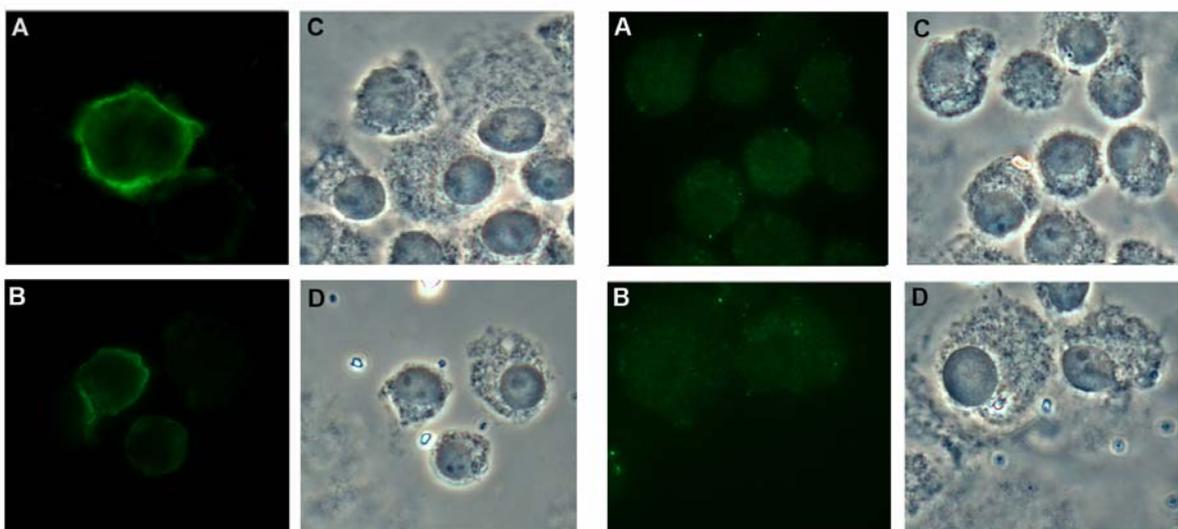
Die Phagozytose der Quarzpartikel scheint also nicht nur von einem Rezeptor mediert zu sein. Aus der Inhibitionsstudie ergibt sich, dass der FcγRII zwar herausragend verantwortlich ist, jedoch eine Beteiligung des MR sowie des CR nicht ausgeschlossen werden kann. Zur Eingrenzung der an der Quarzphagozytose beteiligten Rezeptoren (FcγRII, MR und CR) wurde nun die Immunohistochemie genutzt. In diesem Ansatz sollte die Beteiligung der verschiedenen Rezeptoren an der DQ12 Phagozytose fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden.

Eine FcγRII Immunohistochemie an Zytospinpräparationen von NR8383 Zellen (15min mit 10µg/cm<sup>2</sup>) demonstrierte die aktive Beteiligung dieses Rezeptors am Phagozytoseprozess von DQ12 Partikeln (Abb. 3.3.2.1). Die abgebildeten Zellen der Kontrolle (A, C) zeigen in den Fluoreszenzaufnahmen eine relativ gleichmäßige Verteilung des Rezeptors über die gesamte Zelle. Die Rekrutierung des FcγRII während der Phagozytose ist in der Mikroskopie nach der Belastung mit 10µg/cm<sup>2</sup> DQ12 (B, D) zu verfolgen. Die abgebildeten Zellen zeigen eine deutliche Kondensation des FcγRII (B, grauer Pfeil) an der Partikelbindungsstelle (A, grüner Pfeil) wobei der FcγRII das gebildete Phagosom auskleidet. Färbungen des CR (Abb. 3.3.2.2) oder MR (Abb. 3.3.2.3) zeigen eine solche Rezeptorrekrutierung nicht. In der Immunohistochemie des CR weisen die Zellen der Kontrolle (A, C), wie die belasteten Zellen (10µg/cm<sup>2</sup> DQ12; B, D) eine ähnliche Fluoreszenzverteilung auf. Es zeigen sich keine Veränderungen in der Rezeptorlokalisierung. Ebenso ist in den Fluoreszenzaufnahmen der Kontrolle (A, C), wie in den belasteten Zellen (10µg/cm<sup>2</sup> DQ12; B, D) der MR Färbung eine

gleichmäßig verteilte Intensität über die gesamte Zelle zu beobachten. Auch hier bewirkt die Partikelbelastung keine sichtbare Rezeptoranreicherung an den Orten der Partikelaufnahme. Die immunohistochemischen Resultate bestätigten somit die durchflusszytometrischen Ergebnisse einer hauptsächlich FcγRII vermittelten Quarzphagozytose.



**Abb. 3.3.2.1:** Repräsentative Abbildungen (n=3, original Vergrößerung: x 1000) Fluoreszenz (488nm, links)- und Phasen-Kontrast (rechts) mikroskopischer Aufnahmen einer FcγRII-Immunohistochemie an Zytospinpräparationen unbelasteter (A, C) und belasteter (B, D; 15min, 10μg/cm<sup>2</sup> DQ12) NR8383 Zellen.



**Abb. 3.3.2.2:** Repräsentative Abbildungen (n=3, original Vergrößerung: x 1000) Fluoreszenz (488nm, links)- und Phasen-Kontrast (rechts) mikroskopischer Aufnahmen einer CR-Immunohistochemie an Zytospinpräparationen unbelasteter (A, C) und belasteter (B, D; 15min, 10μg/cm<sup>2</sup> DQ12) NR8383 Zellen.

**Abb. 3.3.2.3:** Repräsentative Abbildungen (n=3, original Vergrößerung: x 1000) Fluoreszenz (488nm, links)- und Phasen-Kontrast (rechts) mikroskopischer Aufnahmen einer MR-Immunohistochemie an Zytospinpräparationen unbelasteter (A, C) und belasteter (B, D; 15min, 10μg/cm<sup>2</sup> DQ12) NR8383 Zellen.

### **3.3.3 Untersuchung der Quarzphagozytose induzierten Signaltransduktionskaskade**

Die Daten der Durchflusszytometrie wie auch die Ergebnisse der Immunohistochemie weisen auf einen Phagozytosemechanismus unter der Beteiligung des FcγRII hin. Die Phagozytose der verschiedenen Rezeptoren unterscheidet sich durch die an der Signaltransduktionskaskade der Phagozytose beteiligten Proteinen (siehe Kapitel 1.3). Dies sollte nun genutzt werden um den für die Quarzphagozytose verantwortlichen Rezeptor über die Untersuchung der Partikelaufnahme vermittelnden intrazellulären Signaltransduktion zu spezifizieren.

#### **3.3.3.1 Untersuchung des GTPasen-Aktivierungsstatus**

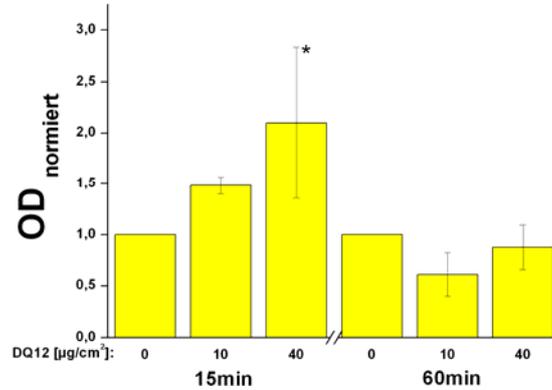
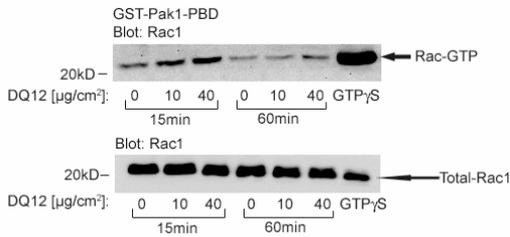
Einen ersten Anhaltspunkt lieferte die Untersuchung des Aktivierungsstatus der möglichen beteiligten GTPasen Rac, Cdc42 und Rho. Der Phagozytose durch die verschiedenen Rezeptoren liegt, wie schon in Kapitel 1.3 beschrieben, ein unterschiedliches GTPase-Aktivierungsmuster zugrunde. In der FcR vermittelten Phagozytose werden Rac und Cdc42 aktiviert, wohingegen bei einer Aufnahme über den CR nur eine Rho Aktivierung stattfindet (Greenberg 1999). Ein MR vermittelter Aufnahmeprozess bedarf hingegen der Aktivierung aller drei genannten GTPasen (Zang et al 2005). Der die DQ12 Aufnahme medierende Phagozytose-Rezeptor sollte sich demnach anhand der aktivierten GTPasen spezifizieren lassen.

Dazu wurden in Pulldown-Assays die aktivierte, GTP gebundene Form der GTPasen Rac1, Cdc42 und Rho, aus Zelllysaten unbelasteter und DQ12 belasteter NR8383 Zellen (15, 60min; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) gefällt, in einer Elektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blots mit dem entsprechenden pan-Antikörper detektiert. Aus einer densitometrischen Auswertung konnte dann der Aktivierungszustand ermittelt werden (*Abb. 3.3.3.1.1*).

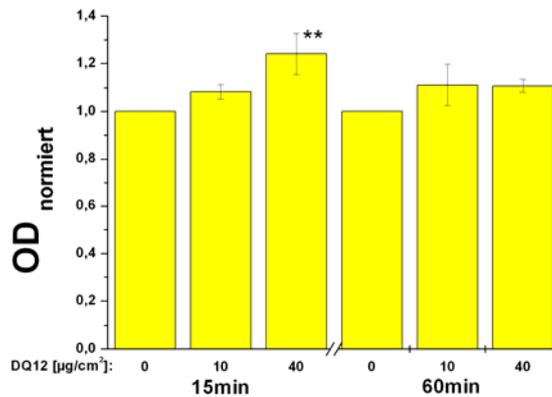
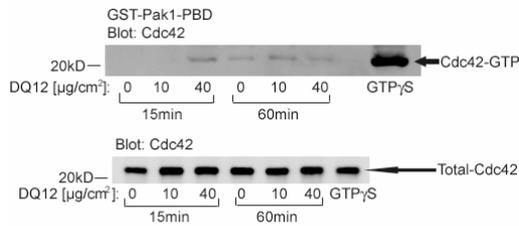
In den Abbildungen der repräsentativen Blots der Pulldown-Assays ist die quarzdosishabhängige Aktivierung der GTPasen Rac1•GTP und Cdc42•GTP nach 15min in einem sich verstärkenden Bandensignal bei einem Molekulargewicht von ca. 21kD (ermittelt anhand der Markerbande bei 20kD) zu verfolgen. Die Banden der Proteinfällung der 60min DQ12 Belastung dagegen, zeigen keine Veränderung. Im Rho•GTP-Blot ist weder nach 15min noch nach 60min eine Veränderung der Bandenintensität als Folge einer DQ12 belastungsbedingten Aktivierung zu beobachten. Zur Überprüfung der Assayfunktionalität wurde eine Positivkontrolle aus GTPγS vorbehandelten Lysat eingesetzt. Des Weiteren erfolgte in einem zusätzlichen Blot eine Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen sowie der GTPase Expression. Dabei wurden die Gesamtllysate elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Blot mit den Antikörpern gegen Rac1, Cdc42 oder Rho detektiert (untere Blotabbildung; Rac1-, Cdc42-, Rho-Total). Ergänzende β-Tubulin-Detektionen, dienten als Ladekontrolle (nicht abgebildet). Durch die detektierten gleichmäßigen Bandenintensitäten

konnte gezeigt werden, dass die Untersuchungen des GTPase-Aktivierungszustandes unter dem Einsatz gleicher Proteinmengen ohne Expressionsunterschiede erfolgten.

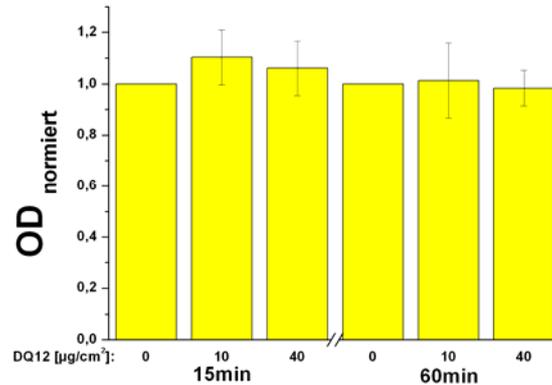
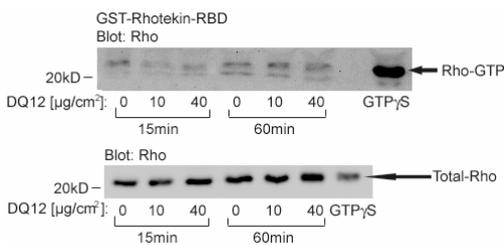
### Rac1•GTP-Pulldown-Assay



### Cdc42•GTP-Pulldown-Assay



### Rho•GTP-Pulldown-Assay



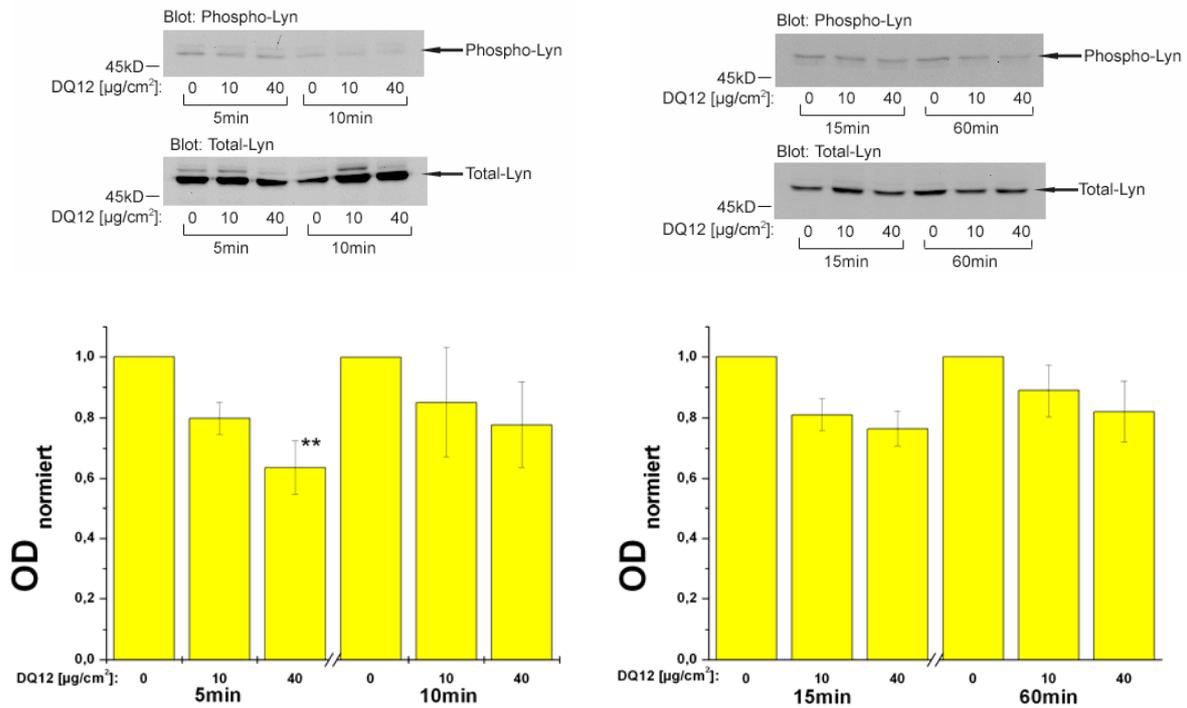
**Abb. 3.3.3.1.1:** Repräsentative Western Blots (links, Detektion: Rac1, Cdc42 und Rho Erstantikörper/anti-Maus Zweitantikörper, Markerbande: 20 kD) der Auftrennung der aktivierten GTPasen (Rac1-GTP, Cdc42-GTP und Rho-GTP), sowie der totalen GTPasen von Proteinlysaten unbelasteter und DQ12 belasteter (15, 60min; 10 und 40µg/cm<sup>2</sup>) Zellen. Nach Fällung der GTP gebundenen Formen (Rac1, Cdc42 mit GST-Pak1-PBD; Rho-GTP mit GST-Rhotekin-RBP) erfolgte die gelelektrophoretisch Auftrennung (12% SDS-Gel) der Präzipitate sowie des Gesamtlysats. Die in der densitometrischen Auswertung ermittelten optischen Dichten (rechts, normiert auf die Kontrolle; Mittelwerte ± SEM; n=3; \* ≡ p<0,05; \*\* ≡ p<0,01) quantifizieren den Aktivierungszustand von Rac, Cdc42 und Rho.

Die Quantifizierung des DQ12 induzierten GTPase-Aktivierungsmusters erfolgte über die densitometrische Auswertung der optischen Dichten, die auf die Kontrolle normiert wurden ( $OD_{\text{normiert}}$ , Abb. 3.3.3.1.1, rechts). Die Belastung mit DQ12 über 15min führt zu einer dosisabhängigen, bei  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikanten, Zunahme der intrazellulär vorliegenden aktiven Form der GTPase Rac1 (Rac1•GTP). Auch die Menge des in den Makrophagen vorliegenden Cdc42•GTP erhöht sich mit steigender Quarzdosis nach einer 15min Belastung dosisabhängig. Ein signifikanter Anstieg wird auch hier bei einer Quarzkonzentration von  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  erreicht. Im Kontrast dazu ist nach einer Belastungszeit von 60min mit gleichen Quarzdosen keine Aktivierung beider GTPasen mehr nachzuweisen. Bei der GTPase Rho war weder nach einer DQ12 Belastung über 15min noch über 60min ( $10$  und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) eine Zunahme der Menge Rho•GTP zu beobachten. Die Ergebnisse der Pulldown-Assays – die quarzdosisabhängige Aktivierung der GTPasen Rac und Cdc42 nach 15min und das Fehlen einer Rho-Aktivierung bestätigt somit die FcR vermittelte Phagozytose, der das gezeigte GTPase Aktivierungsmuster zugeschrieben wird.

### **3.3.3.2 Untersuchung der FcR-Signaltransduktionskaskade**

Die bisherigen Resultate der Untersuchung des DQ12 Aufnahmemechanismus ergaben eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine FcγRII vermittelte Phagozytose, die durch Pulldown-Assays bestätigt wurde. Zur Unterstützung der bisher gesammelten Hinweise erfolgte nun eine detaillierte Untersuchung der in Kapitel 1.3 beschriebenen FcR-Signaltransduktionskaskade. Dazu wurde, dem FcR-Signalweg abwärts folgend, die Aktivierung der Kinasen Lyn, Syk und PI3K, sowie abschließend die Phosphorylierung des inhibitorischen FcγRII B-ITIM-Motivs, durch Western Blot Analysen untersucht.

Im ersten Schritt der FcR-Phagozytosesignalkaskade wird die Src-Kinase Lyn aktiviert. Die Aktivierung dieser Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die maßgeblich an der Phosphorylierung und Polymerisierung des Rezeptors beteiligt ist, geschieht nach der Ligandenbindung, wodurch die Phagozytose eingeleitet wird (Greenberg et al. 1996). Lyn weist verschiedene Tyrosinreste auf, deren unterschiedliche Phosphorylierung die Aktivierung oder Deaktivierung bewirkt. In dieser Studie wird der Phosphorylierungsstatus des Tyrosins in Position 509 (Lyn-Tyr509) untersucht, bei dessen Phosphorylierung die Kinase inaktiv ist. Die Dephosphorylierung an dieser Position führt zur Aktivierung der Lyn-Kinase, was quarzinduziert an Zelllysaten der Kontrolle und DQ12 belasteter Zellen (5, 10, 15 und 60min mit  $10$  als auch  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) in einer elektrophoretischen Auftrennung gezeigt werden soll. In der Western Blot Detektion mit dem spezifischen Phospho-Lyn(Tyr509)-Antikörper, sowie einem pan-Lyn-Antikörper (Ladekontrolle) erfolgte dann die densitometrische Analyse des Phosphorylierungsstatus des Lyn-Tyr509 (Abb. 3.3.3.2.1).

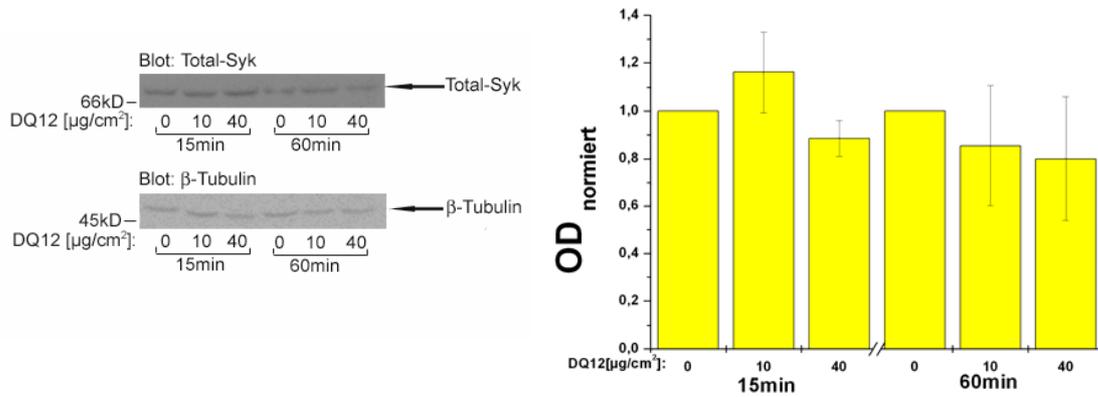


**Abb. 3.3.3.2.1:** Repräsentative Western Blots (oben, Detektion: phosphospezifischer Lyn(Tyr509) (Phospho-Lyn Tyr509)- bzw. pan-Lyn(Total-Lyn, Ladekontrolle)-Erstantikörper/anti-Kaninchen Zweitantikörper, Markerbande bei 45 kD) und densitometrische Auswertung der optischen Dichten (unten, auf die Ladekontrollen bezogener Mittelwerte normiert auf die Kontrolle  $\pm$  SEM; n=5; \*\*  $\equiv$  p<0,01) einer elektrophoretischen Auftrennungen (12% SDS-Gel) von Lysaten der Kontrolle und belasteter NR8383 Zellen (5, 10, 15, 60min; 10 und 40µg/cm<sup>2</sup> DQ12).

In den repräsentativen Blots ist eine Verringerung der Bandenintensität bei 56kD - der Phospho-Lyn(Tyr509)-Bande- mit steigender Quarzdosis innerhalb der verschiedenen Belastungszeiten zu verfolgen. Zur Relativierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde das Bandensignal der entsprechenden Total-Lyn-Detektion (Ladekontrolle) mit demselben Molekulargewicht genutzt. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung zeigen eine signifikante Lyn-Dephosphorylierung nach einer 5min DQ12-Belastung mit 40µg/cm<sup>2</sup>. Insgesamt wird der Phosphorylierungsgrad der Lyn-Kinase durch die Belastung mit steigender DQ12 Konzentration verringert, sodass Lyn zu allen Belastungszeiten dosisabhängig aktiviert wird. Allerdings sinkt das Ausmaß der Dephosphorylierung mit der Länge der Belastung, woraus sich folgendes zeitliches Lyn-Aktivierungsmuster ergibt: 5min > 10 min  $\approx$  15 min > 60 min.

In weiteren elektrophoretischen Auftrennungen der Lysate der 15 und 60min DQ12 Belastung (10, 40µg/cm<sup>2</sup>) sollte nun, der FcR-Phagozytosesignalkette folgend, die DQ12-induzierte Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Syk/Zap-70-Kinase) analysiert werden. Beide, Syk wie auch Zap-70, werden mit der zur Aktinrekrutierung führenden Signalweiterleitung unterhalb des FcR-Rezeptors in Verbindung gebracht (Greenberg et al. 1996), sodass ihre Aktivierung entscheidend für die Phagozytose ist.

Zunächst erfolgte der Nachweis der Expression der Syk-Kinase in NR8383 Zellen, die anhand der Blotdetektion mit einem pan-Syk-Antikörper (Total-Syk) und einem  $\beta$ -Tubulin-Antikörper (Ladekontrolle) nach der elektrophoretischen Auftrennung nachgewiesen wurde (Abb. 3.3.3.2.2).

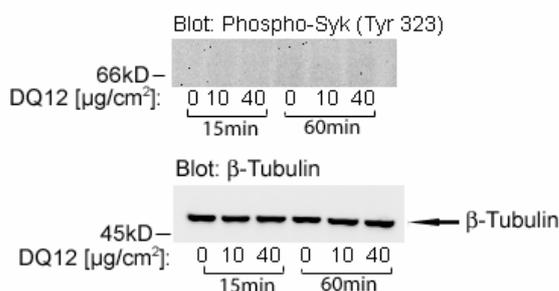


**Abb. 3.3.3.2.2:** Repräsentativer Western Blot (links, pan-Syk (Total-Syk) bzw.  $\beta$ -Tubulin Erstantikörper (Ladekontrolle)/anti-Kaninchen bzw. anti-Maus Zweitantikörper, Markerbanden bei 66kD bzw. bei 45 kD) und densitometrische Auswertung der optischen Dichte (links, auf die Ladekontrolle bezogener Mittelwerte normiert auf die Kontrolle  $\pm$  SEM; n=3) der elektrophoretischen Auftrennung von Lysaten der Kontrolle und belasteter NR8383 Zelle (15, 60min, 10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12).

Die Western Blot Abbildung zeigt gleichmäßige Banden bei 72 kD, deren Intensität von der DQ12 Belastung unbeeinflusst bleibt. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung dieser Banden relativ zur  $\beta$ -Tubulin-Bandenintensität zeigen nach Normierung auf die Kontrolle ebenfalls eine von der DQ12-Belastung unbeeinflusste Syk-Expression.

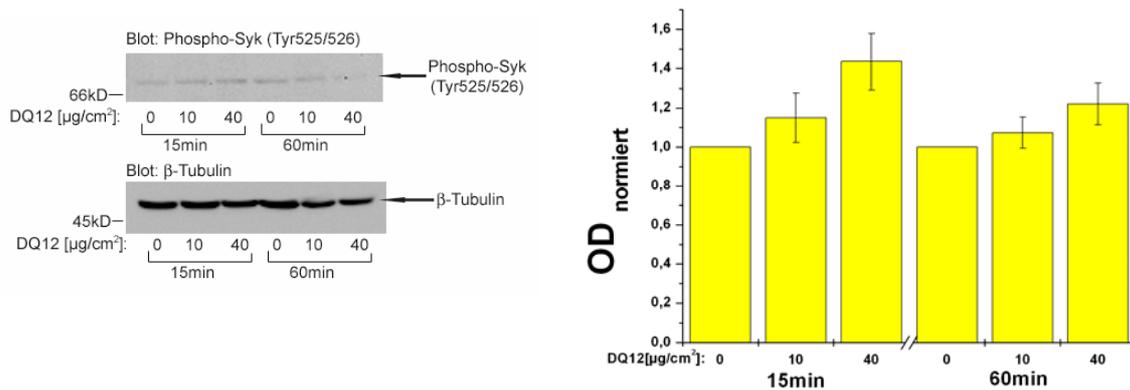
Im Folgenden sollte nun die quarzbedingte Aktivierung der Kinase anhand des Phosphorylierungsstatus analysiert werden. Die Syk-Kinase, die mit der ITAM-Domäne von Immunorezeptoren in Wechselwirkung treten kann, koppelt das Rezeptorsignal mit der intrazellularen Signalkette und weist daher verschiedene funktionelle Tyrosinreste auf. Die Analyse der Phosphorylierung der Tyrosine in den Positionen 323, 525/526 wie auch des Zap(Tyr319)/Syk(Tyr352)-Restes erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper.

Eine Phosphorylierung des negativ, regulatorischen Syk-Tyrosins-323 konnte weder in den Kontrollen, noch DQ12 belastungsbedingt in den Lysaten der NR8383 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3.2.3).



**Abb. 3.3.3.2.3:** Repräsentativer Western Blot (n=5, Detektion mit Phospho-Syk(Tyr323) bzw.  $\beta$ -Tubulin Erstantikörper/ anti-Kaninchen bzw. Maus Zweitantikörper, Markerbanden bei 66kD bzw. bei 45 kD) einer elektrophoretischen Auftrennung (12% SDS-Gel) von Lysaten der Kontrolle sowie belasteter NR8383 Zellen (15, 60min; 10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Dagegen zeigte sich eine Phosphorylierung der Tyrosine an Position 525 und 526 der Syk-Kinase (Abb. 3.3.3.2.4), wie auch des Zap-70(Tyr319)/Syk(Tyr352)-Restes (Abb. 3.3.3.2.5). Durch die Western Blot Analyse wurde zunächst die DQ12 induzierte Phosphorylierung des Syk-Tyrosinreste in Position 525 und 526, die sich in der aktiven Schleife der Kinase befinden und essentiell für die Syk-Funktion sind (Zhang et al. 2000), mit einem spezifischen Syk(Tyr525/526)-Antikörper untersucht (Abb. 3.3.3.2.4).

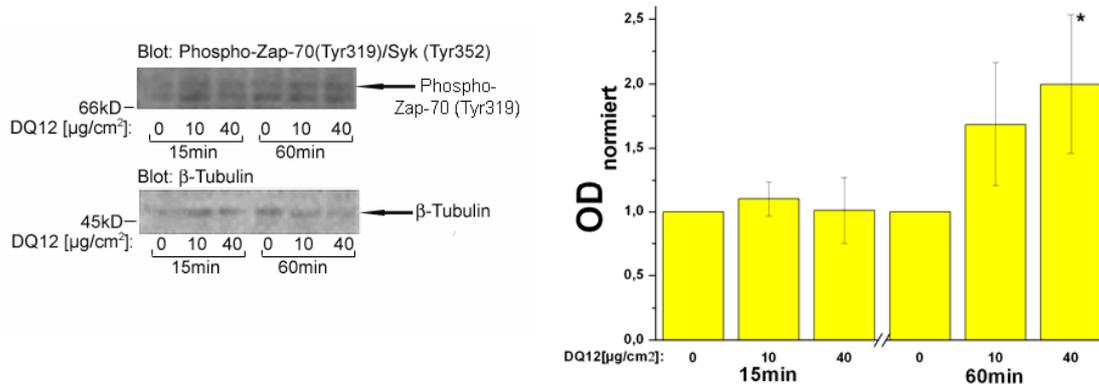


**Abb. 3.3.3.2.4:** Repräsentativer Western Blot (links, Detektion: Phospho-Syk(Tyr525/526) bzw.  $\beta$ -Tubulin Erstantikörper/anti-Kaninchen bzw. Maus Zweitantikörper; Markerbanden bei 66kD bzw. bei 45) und densitometrische Auswertung der optischen Dichte (rechts, auf die Ladekontrollen relativierter Mittelwerte normiert auf die Kontrolle  $\pm$  SEM, n=3) der elektrophoretischen Auftrennungen von Lysaten der Kontrolle und belasteter Zellen (15, 60min; 10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12).

Eine DQ12-dosisabhängige Phosphorylierung des Syk-Tyrosinrestes an Position 525/526 lässt sich in der Abbildung des Western-Blots, durch das sich bei 72kD verstärkende Bandensignal verfolgen. Die densitometrische Auswertung dieser Bande, die auf die Tubulinbande (Ladekontrolle) relativiert und auf die Kontrolle normiert wurde, zeigt nach beiden Inkubationszeiten (15 und 60min) eine, sich mit steigender Quarzkonzentration (10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) verstärkende, optische Dichte ( $\text{OD}_{\text{normiert}}$ ). Die Syk Kinase wird DQ12 dosisabhängig aktiviert, allerdings scheint diese mit der Erhöhung der Belastungszeit von 15 auf 60 min, wie schon bei der Lyn-Kinase zu verfolgen war, abzunehmen.

Während sich eine stärkere, quarzbedingte Phosphorylierung des Syk-Kinase Tyrosin(525/526)-Restes zu einem frühen Belastungszeitpunkt (15min) verfolgen ließ, erscheint eine DQ12 dosisabhängige Phosphorylierung des Zap(Tyr319)/Syk(Tyr352)-Restes erst nach der langen Belastungszeit von 60min (Abb. 3.3.3.2.5). Eine Verstärkung der Bandenintensität infolge der Phosphorylierung relativ zur Bandenintensität der Ladekontrolle ( $\beta$ -Tubulin) lässt sich in der repräsentativen Abbildung des Western Blots nach einer Belastungszeit von 60min verfolgen. Auch die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung, der auf  $\beta$ -Tubulin relativierten, auf die Kontrolle normierten optischen Dichten, zeigen eine späte DQ12 induzierte Aktivierung. Die detektierte Signalintensität steigt nur nach einer Inkubationszeit von 60min mit steigender Quarzkonzentration (10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

an, sodass nach der 60min Belastung mit der hohen DQ12 Konzentration ( $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) eine signifikante Verstärkung der Phosphorylierung des Tyrosinrestes Zap(Tyr319)/Syk(Tyr352) zu beobachten ist.



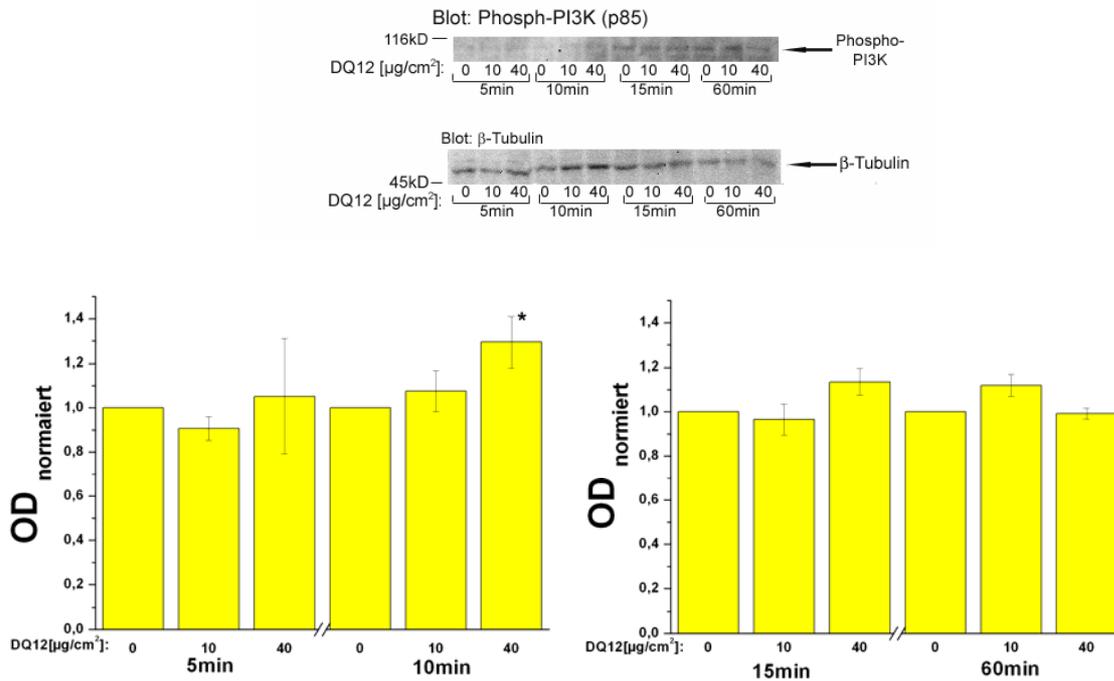
**Abb. 3.3.3.2.5:** Repräsentativer Western Blot (links, Detektion: Phospho-Zap(Tyr319)/Syk(Tyr352) bzw. β-Tubulin Erstantikörper/anti-Kaninchen bzw. -Maus Zweitantikörper; Markerbanden bei 66kD bzw. bei 45) und densitometrischen Auswertung der optischen Dichte (rechts, auf die Ladekontrollen bezogener Mittelwerte normiert auf die Kontrolle  $\pm$  SEM; n=3; \*  $\equiv$  p<0,05) der elektrophoretischen Auftrennung (12% SDS-Gel) von Lysaten der Kontrolle und belasteter Zelle (15, 60min; 10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12).

Bisher konnte eine quarzinduzierte Aktivierung der Lyn-Kinase in Form der Dephosphorylierung des Tyrosinrestes 509, sowie der Syk-Kinase mit der Phosphorylierung der Tyrosine in Position 525/526 als auch des Tyrosinrestes Zap(Tyr319)/Syk(Tyr352) gezeigt werden. Während die Kinasen Lyn und Syk im phagozytotischen Prozess über die GTPasen die Aktinrekrutierung vermitteln, ist die im folgenden untersuchte PI3-Kinase unter anderem an der Regulation der Membranverschiebung während der Pseudopodienverlängerung beteiligt (Cox et al 1999). Im Folgenden soll die Phosphorylierung der kleineren, regulatorischen p85 Untereinheit der PI3K, die aus einer 110kD- sowie einer 85kD-Untereinheit besteht, untersucht werden.

Die Untersuchung der DQ12 induzierten Aktivierung der PI3K erfolgte durch die elektrophoretische Auftrennung von Lysaten der Kontrollen sowie 5, 10, 15 und 60 min DQ12 belasteter Zellen ( $10, 40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Für die Analyse wurden die Western Blots zunächst mit einem phosphospezifischen p85-PI3K- gefolgt vom β-Tubulin-Antikörper (Ladekontrolle) detektiert. Die repräsentative Western Blot Abbildung als auch die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung zeigen eine DQ12 induzierte Phosphorylierung der Bande bei 85kD nach 10 min (Abb. 3.3.3.2.6).

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung zeigen die Veränderung des Phosphorylierungsgrades der PI3K nach Quarzbelastung. Nach Belastungszeiten von 5, 15 oder 60min lässt sich keine DQ12-dosisabhängige Aktivierung der PI3K feststellen. Eine dosisabhängige Phosphorylierung ist nur am Anstieg der auf β-Tubulin relativierten, auf die

Kontrolle normierten optischen Dichten nach einer Belastungszeit von 10min zu beobachten, die bei einer Dosis von  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikant ist.

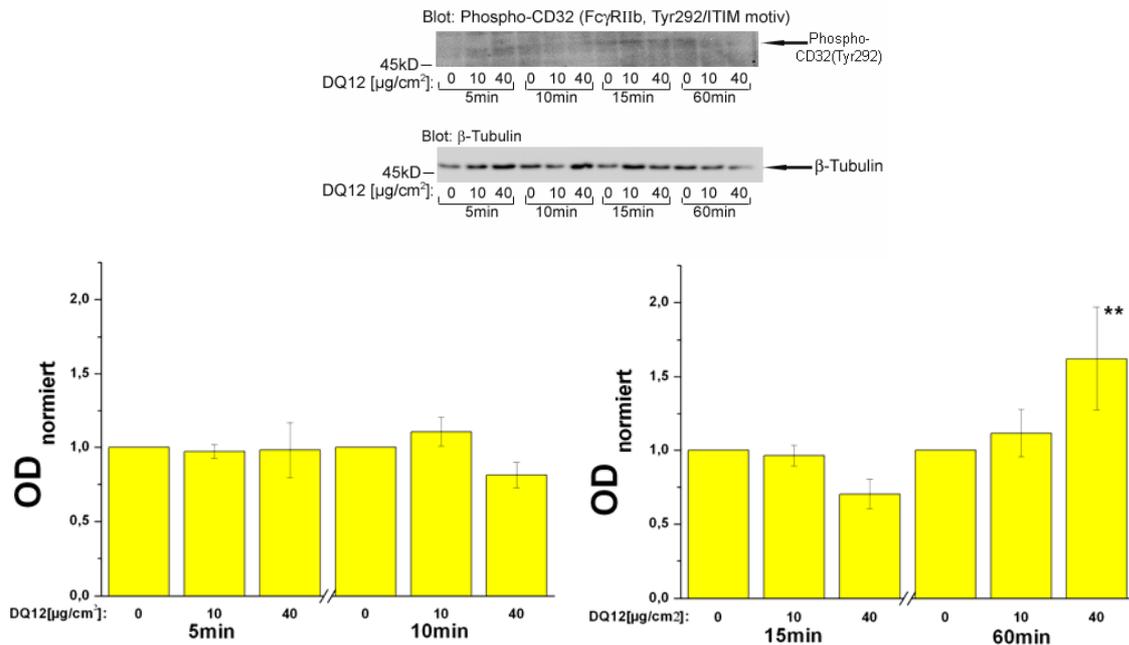


**Abb. 3.3.3.2.6:** Repräsentativer Western Blot (oben, Detektion: phosphospezifischer-p85PI3K bzw.  $\beta$ -Tubulin (Ladekontrolle) Erstantikörper/anti-Kaninchen bzw. -Maus Zweitantikörper, Markerbanden bei 116kD bzw. bei 45) und densitometrischen Auswertung der optischen Dichte (auf die Ladekontrollen bezogener Mittelwerte normiert auf die Kontrolle  $\pm$  SEM; n=4; \*  $\equiv$  p<0,05) der elektrophoretischen Auftrennungen von Lysaten der Kontrolle und belasteter Zelle (5, 10, 15, 60min; 10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12).

Die Intensität der quarzinduzierten Phosphorylierungen der Kinasen, sowie die Aktivierung der GTPasen ließen über eine Belastungszeit von 60min nach oder waren sogar nicht mehr nachweisbar. Ob dieses Aktivierungsmuster von einer verminderten Phagozytoseaktivität verursacht wird, die auf eine Inhibition des Rezeptors zurückzuführen ist, sollte nun in einem letzten Schritt der Analyse der Phagozytosesignaltransduktion untersucht werden. Dabei wurde der Phosphorylierungsstatus des inhibierenden Fc $\gamma$ RII B-Motivs (ITIM, immunoreceptor tyrosinbased inhibitory motif) untersucht, welches in Makrophagen die Phagozytose negativ regulieren kann (Hunter et al. 1998).

Die Untersuchung der ITIM(Tyr292)-Phosphorylierung erfolgte durch die elektrophoretische Auftrennung von Lysaten der Kontrollen sowie über 5, 10, 15 und 60min DQ12 belasteter Zellen ( $10, 40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Die Detektion des Phosphorylierungsstatus erfolgte am Western Blot mit Hilfe eines phosphospezifischen-Fc $\gamma$ RII B und des  $\beta$ -Tubulin-Antikörpers (Ladekontrolle). In *Abb. 3.3.3.2.7* sind ein repräsentativer Western Blot, sowie die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung zusammengefasst. Belastungen über 5, 10 und 15min zeigen keinen Effekt auf die Stärke der Phosphorylierung. Eine DQ12 induzierte Intensitätserhöhung der Bande bei 40kD ließ sich erst nach einer Belastungszeit von 60min verfolgen, die auch

anhand der zu  $\beta$ -Tubulin relativierten, auf die Kontrolle normierten Werte der optischen Dichte zu verfolgen ist. Nur eine Belastung über 60min führt zu einer dosisabhängigen Phosphorylierung des ITIM-Motivs, die bei einer Dosis von  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Signifikanz erreicht.



**Abb. 3.3.3.2.7:** Repräsentativer Western Blot (oben, Detektion: phosphospezifischer-Fc $\gamma$ RIIb(Tyr292) bzw.  $\beta$ -Tubulin(Ladekontrolle) Erstantikörper/anti-Kaninchen bzw. -Maus Zweitantikörper, Markerbanden bei 45kD) und densitometrische Auswertung der optischen Dichte (unten, auf die Ladekontrollen bezogener Mittelwerte normiert auf die Kontrolle  $\pm$  SEM; n=6; \*\*  $\equiv$  p<0,01) der elektrophoretischen Auftrennungen (12% SDS-Gel) von Lysaten un- und belasteter NR8383 Zellen (5, 10, 15, 60min; 10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12).

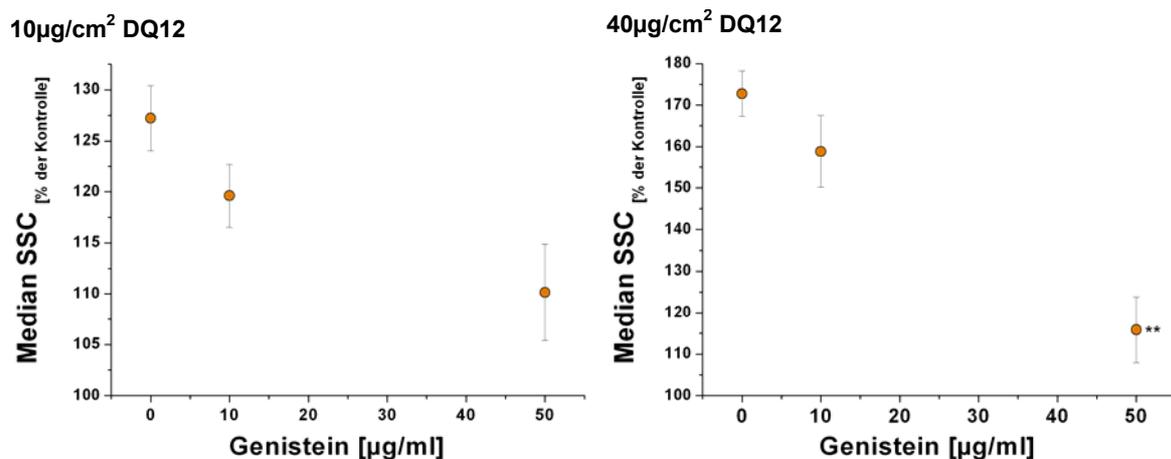
In der proteinbiochemischen Untersuchung der Aktivität der GTPasen und Kinasen ließ sich die in Kapitel 1.3 beschriebene FcR-Signaltransduktionskette für die DQ12-Phagozytose nachvollziehen. Es konnte gezeigt werden, dass während der Quarzphagozytose die GTPasen Rac1 und Cdc42, sowie die Kinasen Lyn, Syk und PI3K aktiviert werden, wodurch der Fc $\gamma$ RII als für die Aufnahme verantwortlicher Rezeptor spezifiziert wurde. Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass während der 1h Belastung die FcR-Signalkette durch Quarz innerhalb der ersten 15min aktiviert wird und dann im weiteren Verlauf wieder abebbt, was durch die Aktivierung des inhibitorischen Rezeptormotiv hervorgerufen sein könnte.

### 3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der Quarzaufnahme nach Inhibition verschiedener Mediatoren der FcR-Phagozytose-Signaltransduktionskaskade

Die Hypothese der Fc $\gamma$ RII vermittelte Quarzphagozytose wurde einer weiteren Prüfung unterzogen. Dabei sollte die aktive Beteiligung sowohl der Tyrosin-Kinasen, als auch der GTPasen, unter besonderer Berücksichtigung von Rac1, an der Partikelaufnahme untersucht werden. Für diese durchflusszytometrische Analyse der DQ12 Aufnahme kamen spezifische Inhibitoren einzelner Mediatoren des Phagozytosesignalweges zum Einsatz.

#### 3.3.4.1 Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der Tyrosin-Kinasen-Aktivität auf die Quarzaufnahme

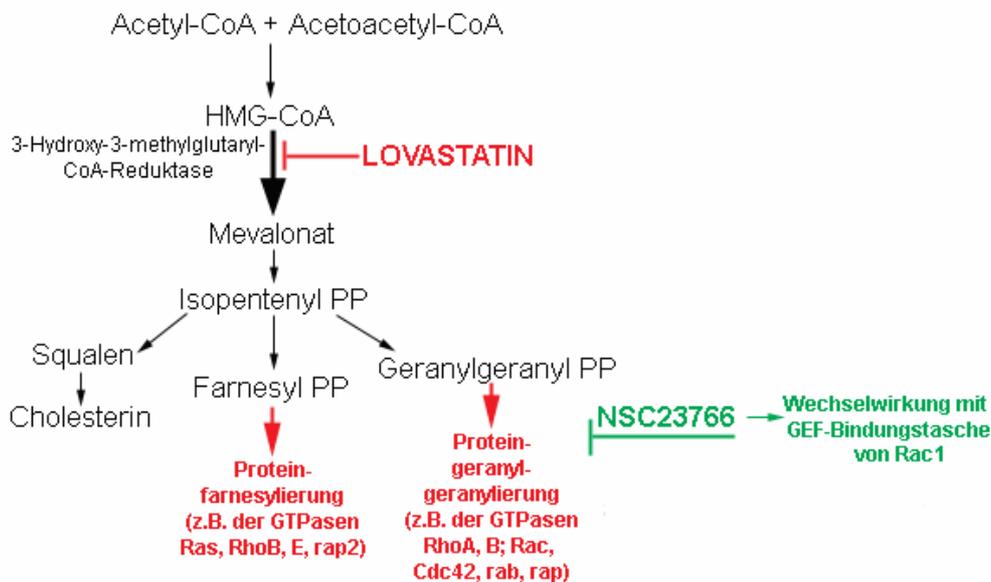
Zunächst sollte der Einfluss der Tyrosin-Kinasen-Aktivität auf die DQ12 Phagozytose durch den Einsatz von Genistein untersucht werden. Das Isoflavon Genistein inhibiert spezifisch die Tyrosinphosphorylierungen der Tyrosin-Kinasen, deren Aktivität für die FcR vermittelte Phagozytose essentiell ist (Akiyama et al 1987, Greenberg 1993). Die Inhibition erfolgte durch die Inkubation der NR8383 Zellen vor- und während der DQ12-Belastung (1h, 10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) mit 2 verschiedenen Genistein-Konzentrationen (10 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), worauf die Partikelaufnahme, wie zuvor beschrieben durchflusszytometrisch untersucht wurde. Aus der Auswertung des gemessenen Median SSC ergab sich für beide Quarzkonzentrationen eine durch Genistein dosisabhängig reduzierte Partikelaufnahme, die bei der hohen Quarzdosis und Genistein-Konzentration signifikant war (Abb. 3.3.4.1). Dabei führte die Inkubation mit Genistein-Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei beiden DQ12-Belastungsdosen zu einer Verminderung des Median SSC, respektive der Aufnahme, auf das Niveau der Aktin- oder Fc $\gamma$ RII-Inhibition.



**Abb. 3.3.4.1:** Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv 100\%$ )  $\pm$  SEM; n=3; \*\* $\equiv p < 0,01$  signifikante Reduktion gegen die Kontrolle; Varianzanalyse, 95% Konfidenzintervall) durch die Belastung mit Quarz über 1h mit Dosen von 10 (rechts) und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (links) unter Inkubation mit dem Tyrosin-Kinasen-Inhibitor Genistein (10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

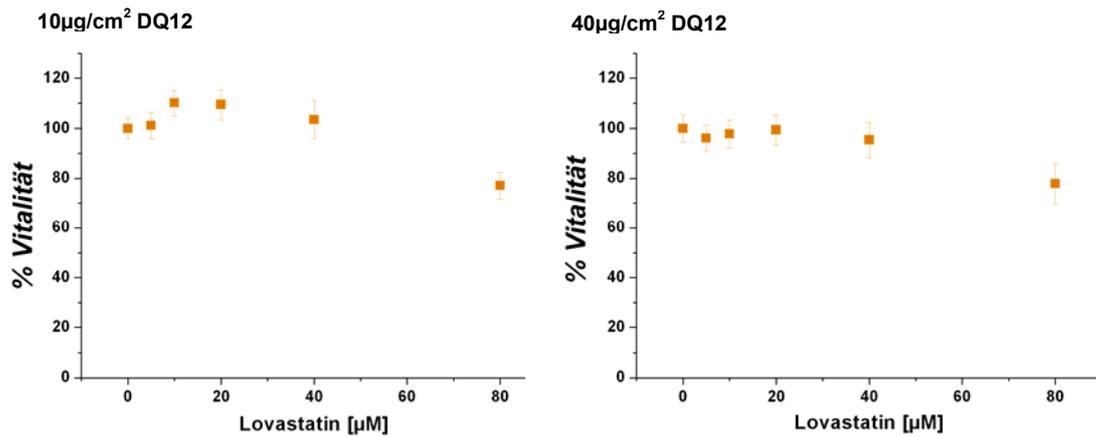
### 3.3.4.1 Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der GTPase Aktivität auf die Quarzaufnahme

Als nächstes sollte die Auswirkung der Inhibition der GTPasen-Aktivierung auf die Quarzphagozytose untersucht werden. Dabei wurde als erstes der Effekt von Lovastatin auf die Quarzaufnahme in den Makrophagen untersucht. Das auch für seine anti-inflammatorische Wirkung bekannte Statin verhindert über die Hemmung der Cholesterin-Biosynthese die Prenylierung der GTPasen (Abb. 3.3.4.2). Dabei inhibiert es die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase, wodurch die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat und die Bildung der Isoprenyllipide Farnesylpyrophosphat (Farnesyl PP) und Geranylgeranylpyrophosphat (Geranylgeranyl PP) unterbunden wird. Diese sekundären Proteinmodifikationen sind entscheidend für die Aktivierung der für die FcR-vermittelten Phagozytose essentiellen GTPasen (Loike et al 2004, Monick et al 2003).

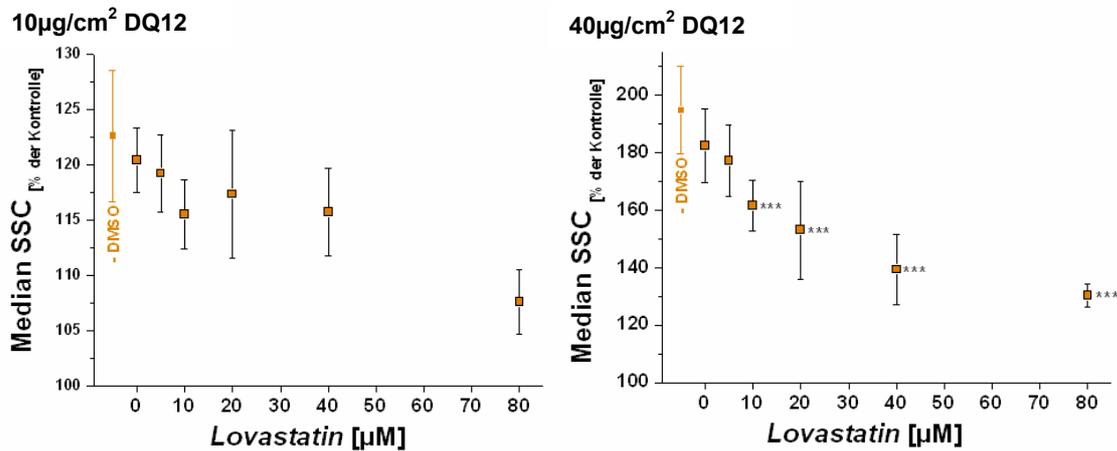


**Abb. 3.3.4.2:** GTPase-Inhibition durch Lovastatin und NSC23766. (erstellt nach Monick et al 2003; Gao et al 2004).

Die Inhibition erfolgte durch die Inkubation der Makrophagen vor und während der 1h DQ12-Belastung (10, 40µg/cm<sup>2</sup>) mit Lovastatin steigender Konzentration (5, 10, 20, 40 und 80µM). Ein MTT-Assay zeigte, dass bei den eingesetzten Inhibitorkonzentrationen für beide Quarzdosen keine signifikanten zelltoxischen Effekte auftraten (Abb. 3.3.4.3). Die Untersuchung der Partikelaufnahme erfolgte auch hier durchflusszytometrisch, durch die Analyse der Median SSC-Diagramme (Abb. 3.3.4.4)



**Abb. 3.3.4.3:** Im MTT-Assay gemessene Vitalität (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3; student-t-test) von NR8383 Zellen nach einer Belastung über 1h mit 10 und 40 µg/cm<sup>2</sup> DQ12 unter Vorinkubation mit Lovastatin steigender Konzentrationen (5, 10, 20, 50, 80 µM).

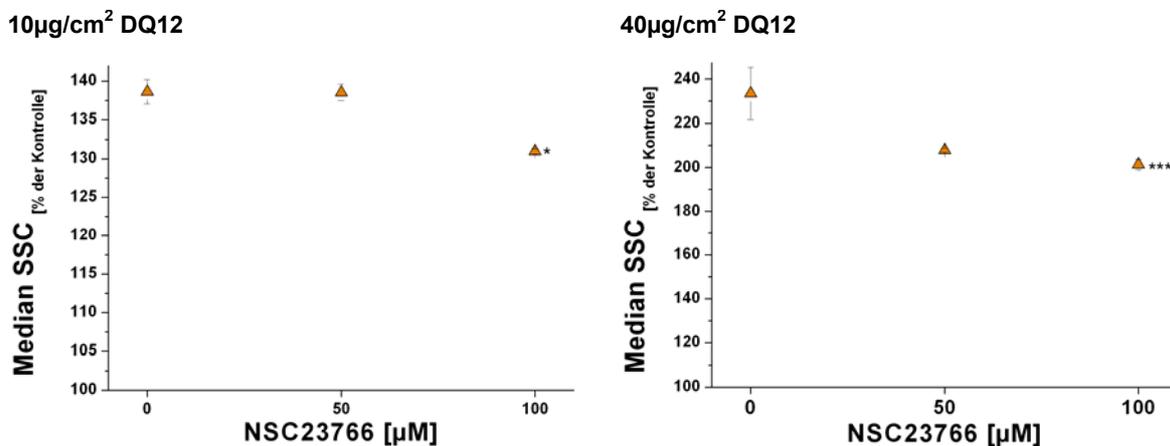


**Abb. 3.3.4.4:** Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv$  100%)  $\pm$  SEM; n=4; \*\*\* $\equiv$  p<0,001 signifikante Reduktion gegen die Kontrolle) durch die 1h Belastung mit 10 (rechts) und 40 µg/cm<sup>2</sup> (links) DQ12 unter Inkubation mit Lovastatin steigender Konzentration (5, 10, 20, 40, 80 µM).

In den Auftragungen des normierten Median SSC gegen die Lovastatin-Konzentration ist für beide Quarzkonzentrationen (10 µg/cm<sup>2</sup>, links; 40 µg/cm<sup>2</sup>, rechts) eine von der Lovastatin-Konzentration abhängige Inhibition der Phagozytose zu verfolgen, die bei beiden Quarzdosen etwa das Niveau der Aktin- oder FcγRII-Inhibition erreichte. Die Inhibition der GTPase-Aktivität führte bei der 10 µg/cm<sup>2</sup> DQ12-Belastung zu einer, jedoch nicht signifikanten, Reduktion des Median SSC um 15% (80 µM Lovastatin). Bei der hohen Quarzdosis konnte die Aufnahme durch die Inkubation mit Lovastatin dosisabhängig (um 15%, 5 µM - 60%, 80 µM), mit einer signifikanten Verminderung des Median SSC ab einer Lovastatin Konzentration von 10 µM gesenkt werden. Das Lovastatin-Lösungsmittel DMSO zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Mess-Signal.

In einer weiteren inhibitorischen Aufnahmeuntersuchung wurde der Inhibitor NSC23766 eingesetzt, der im Gegensatz zu Lovastatin, spezifisch nur Rac1 inhibiert. Diese chemische Substanz zeigt weder auf Rho noch auf Cdc42 einen inhibitorischen Effekt, da NSC23766 spezifische an die GEF(Guanine nucleotide exchange factor)-bindende Proteintasche der Rac1-GTPase bindet. Rac1-GEF's sind unter anderem Trio und Tiam1, die den GTP/GDP-Austausch an der GTPase katalysieren und diesen dadurch aktivieren. Durch die spezifische Bindung von NSC23766 an die Rac1-GEF-Bindungstasche wird die Aktivierung der GTPase Rac1, die ein wichtiger Mediator in der FcR-vermittelten Phagozytose ist, unterbunden (Gao et al 2004).

Die durchflusszytometrische Analyse der Rac1 Inhibition erfolgte nach 24h Vorinkubation mit 50 und 100µM NSC23766 an 1h DQ12-belasteten (10, links; 40µg/cm<sup>2</sup>, rechts) NR8383 Zellen durch die Bestimmung des Median SSC (Abb. 3.3.4.5).



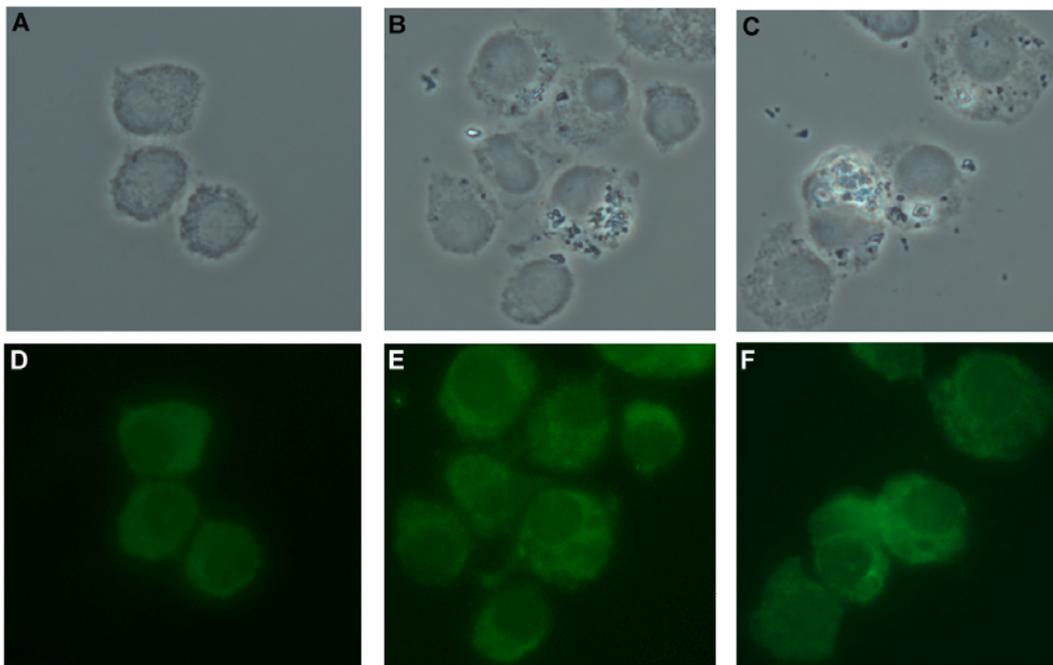
**Abb. 3.3.4.5:** Erhöhung des Median des SSC (Side-Scatter-Angle, Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv$  100%)  $\pm$  SEM; n=3; \* $\equiv$  p<0,05, \*\*\* $\equiv$  p<0,001 signifikante Reduktion gegen die Kontrolle; Varianzanalyse, 95% Konfidenzintervall) nach der 1h Belastung mit DQ12 Dosen von 10 (rechts) und 40µg/cm<sup>2</sup> (links) unter Inkubation mit dem Rac1 spezifischen Inhibitor NSC23766 (50 und 100µM).

Während die DQ12-Phagozytose unter Verwendung einer Inhibitorkonzentration von 50µM nicht signifikant reduziert werden konnte, führte die Erhöhung der NSC23766-Konzentration auf 100µM zu einer signifikanten Reduktion der Partikelaufnahme, wodurch die aktive Beteiligung von Rac1 an der Quarzaufnahme gezeigt werden konnte. Allerdings wurde mit NSC23766 unter den experimentellen Bedingungen keine Inhibition in der Stärke der Aktin- oder FcγRII-Inhibition erzielt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Quarzphagozytose zum einen von der Tyrosin-Kinasen-Aktivität und zum anderen von der GTPase-Aktivierbarkeit, im speziellen Fall des NSC23766 von der Aktivierbarkeit der GTPase Rac1, abhängig ist. Diese Ergebnisse bestätigen weiter die Beteiligung des FcγRII an der Quarzphagozytose.

### 3.3.5 Immunohistochemische Untersuchung der GTPase Rac1 während der Partikelaufnahme

Abschließend wurde die aktive Beteiligung der GTPase Rac1 an der Phagozytose von DQ12-Partikeln immunohistochemisch untersucht. Die Rac1 Immunohistochemie wurde an Zytospinpräparationen von NR8383 Zellen nach einer DQ12 Belastung von 15min (10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) mit einem spezifischen Rac1-Erstantikörper und dem 488-Floureszenz-Zweitantikörper durchgeführt. In den Abbildungen der mikroskopischen Phasen-Kontrast- und Fluoreszenzaufnahmen ist die aktive Beteiligung der GTPase am Quarzphagozytoseprozess anhand der Clusterung der GTPase um die Partikel zu verfolgen (Abb. 3.3.5.1). Während die abgebildeten Zellen der Kontrolle (A, D) eine relativ gleichmäßige Rac1-Verteilung innerhalb der Zelle zeigen, ist nach der Belastung mit einer DQ12 Dosis von 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (B, E) und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (C, F) eine Kondensation der GTPase an den Partikel (siehe B, C; Phasen-Kontrast) enthaltenden Phagosomen zu verfolgen.



**Abb. 3.3.5.1:** Repräsentative (n=3, original Vergrößerung: x 1000) Abbildungen mikroskopischer Phasen-Kontrast (obere Reihe)- und Fluoreszenz (488nm, untere Reihe)-Aufnahmen einer Rac1-Immunohistochemie an Zytospinpräparationen unbelasteter (A, D) und 15min mit einer Quarzkonzentration 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (B, E) und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (D, F) belasteter NR8383 Zellen.

Somit konnte die aktive Beteiligung der GTPase Rac1 durch drei unabhängige Methoden (durchflusszytometrischen Messung der Partikelaufnahme unter Rac1-Inhibition mit NSC23766, Rac1 Pulldown-Assays, Rac1 Immunohistochemie) bestätigt werden.

### 3.4 Die Bedeutung der Partikelaufnahme für die Entzündungsreaktion

Zum Abschluss sollte untersucht werden, welche Rolle die Partikelaufnahme und die daran beteiligten Mediatoren, in der Entzündungsreaktion der Makrophagen auf die DQ12-Exposition spielen. Dies wurde exemplarisch durch die Untersuchung der DQ12 induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, der ROS-Generierung und der TNF- $\alpha$ -Freisetzung unter besonderer Berücksichtigung des Aktinzellskeletts und des Fc $\gamma$ RII analysiert.

#### 3.4.1 Die DQ12 induzierte Entzündungsantwort in NR8383 Zellen

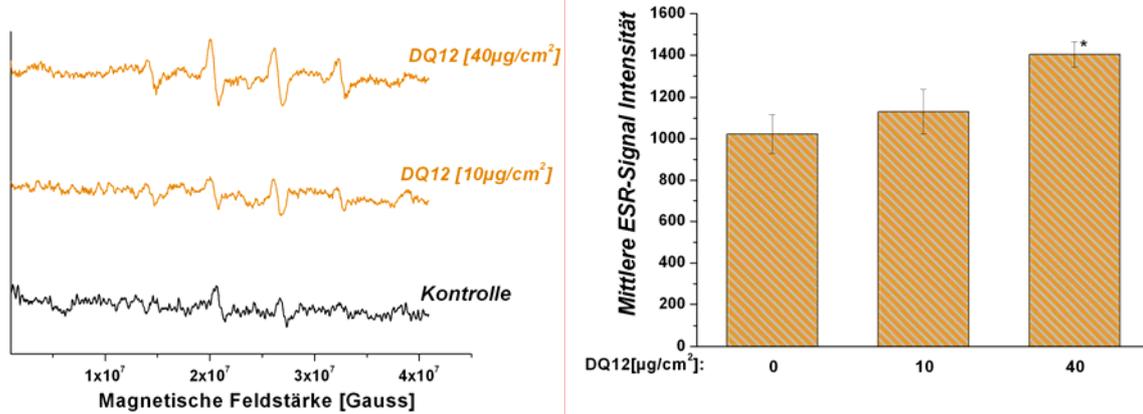
Makrophagen sind über die Generierung von ROS, der Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie durch die Bildung und Freisetzung entzündungsfördernder Chemokine und Zytokine (wie z.B. TNF- $\alpha$ ) maßgeblich an der Entwicklung der Quarz induzierten Entzündungen beteiligt (Castranova 2004, siehe Kapitel 1.1.3). Dieser Mechanismus des *in vivo* zur Entzündung führenden Prozesses sollte zunächst durch die Belastung mit DQ12 in NR8383 Zellen nachgewiesen werden.

##### 3.4.1.1 Die DQ12 induzierte ROS-Generierung

Die als Initiation der Entzündung angesehene DQ12-Partikel induzierte ROS-Generierung wurde als erstes untersucht. Dabei kamen mit der ESR-Spektroskopie, unter Verwendung von DMPO als Spintrap (Radikalfalle), der durchflusszytometrischen Messung der Rhodamin-Fluoreszenz und der Bestimmung der Chemilumineszenz in einem Lucigenin-Assay drei unterschiedliche Methoden, zum Einsatz.

Mittels der ESR-Spektroskopie konnte, nach der 1h Belastung von NR8383 Zellen in HBSS<sup>(+/+)</sup> mit DQ12 (10, 40 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), durch die Verwendung des nichtmembranpermeablen DMPO, die Radikalgenerierung im Zellüberstand (extrazellulär) quantifiziert werden (Abb. 3.4.1.1.1). Die exemplarischen ESR-Spektren (links) zeigen, im Vergleich zur Kontrolle, eine deutliche Verstärkung der Signalintensitäten bei den Magnetischen Feldstärke von 1,5x10<sup>7</sup>, 2,1x10<sup>7</sup>, 2,65x10<sup>7</sup> und 3,25x10<sup>7</sup> Gauß, infolge der DQ12-Belastung (1h; 10, 40  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>). Die Ergebnisse der Auswertung der mittleren ESR-Signal-Intensität aus der Analyse dieser Spektren (rechts) zeigt eine DQ12-dosisabhängige Erhöhung der mittleren ESR-Signal-Intensität, die bei 40 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> signifikant ist.

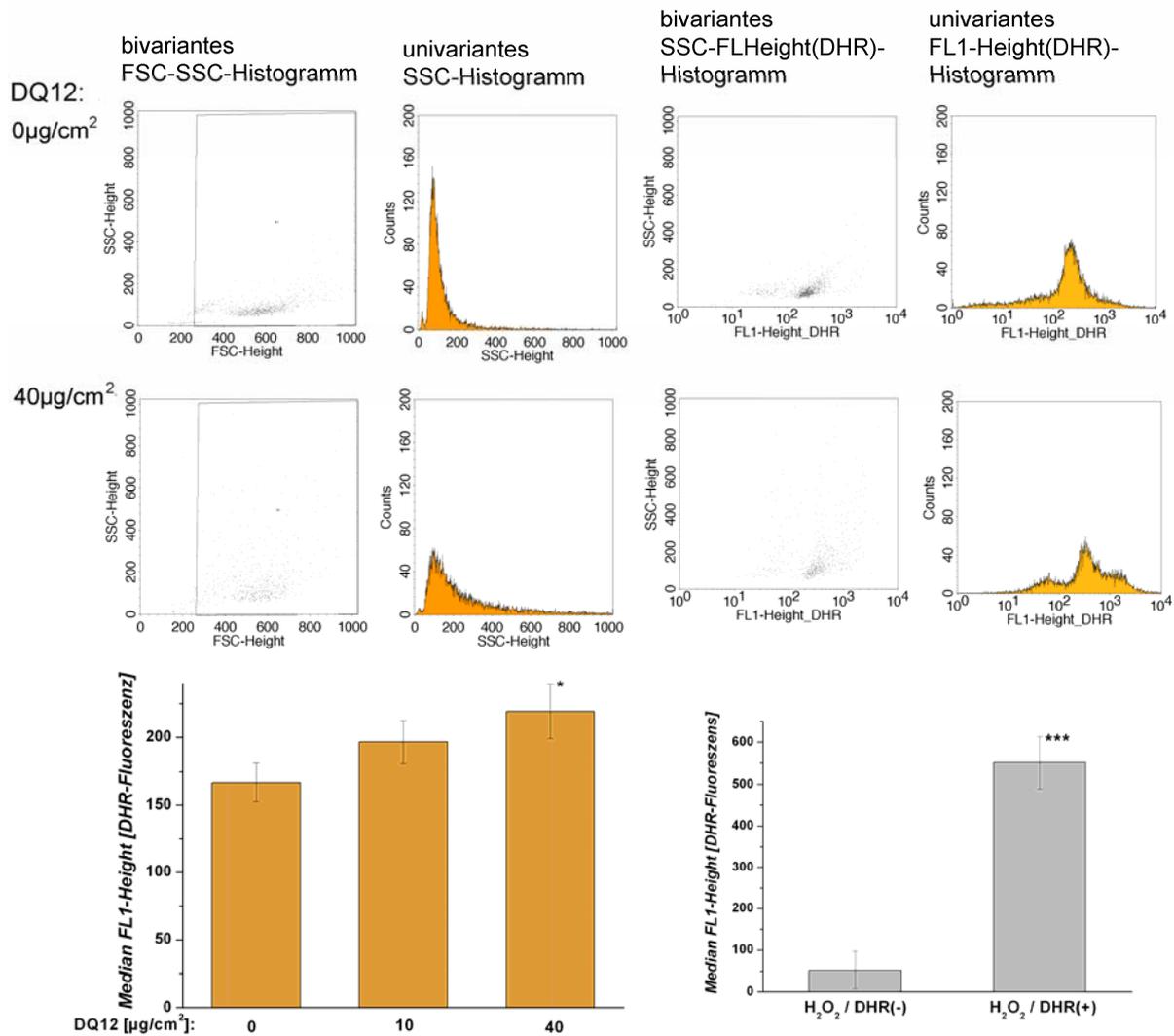
Die durchflusszytometrische ROS-Messung erfolgte an 1h mit DQ12 (10, 40 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) in HBSS<sup>(+/+)</sup> belasteten NR8383 Zellen, durch die Messung der Fluoreszenz (530nm) von Rhodamin. Dieses wird durch die Radikalgenerierung in der Zelle, als Oxidationsprodukt des nicht fluoreszierenden, zellpermeablen DHR123 gebildet und ist somit ein Maß für die intrazelluläre ROS Generierung (Abb. 3.4.1.1.2). Die Messung der Rhodamin-Fluoreszenz wurde dabei unter gleichzeitiger Detektion des SSC durchgeführt.



**Abb. 3.4.1.1.1:** Repräsentative ESR-Spektren (rechts, 4 Signale des DMPO-Methylradikalprodukts) sowie Darstellung der mittlere ESR-Signal-Intensität (links, Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4; \* $\equiv$  p<0,05) der Kontrolle und DQ12-belasteter NR8383 Zellen (1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>).

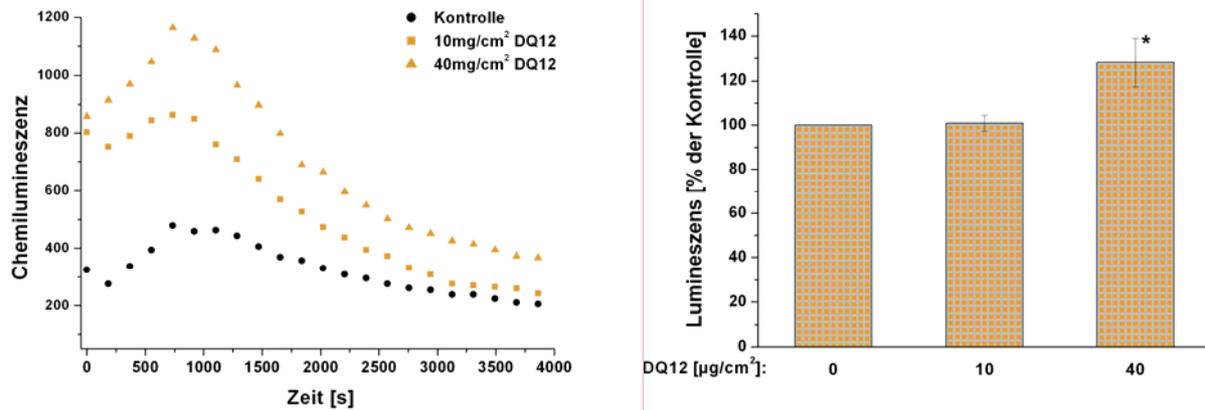
In den exemplarischen bivarianten FSC-/SSC- und univarianten SSC(gated)-Histogrammen (linke Doppelreihe) ist die Partikelaufnahme durch die Veränderung der SSC-Verteilung im Vergleich zwischen Kontrolle und der 1h DQ12-Belastung (40 µg/cm<sup>2</sup>) zu verfolgen. In den repräsentativen bivarianten SSC-/FL1-Height(DHR-Fluoreszenz)- und univarianten FL1-Height(DHR-Fluoreszenz, gated)-Histogrammen der Kontrolle, sowie der 40 µg/cm<sup>2</sup> DQ12-Belastung (rechte Doppelreihe) ist die ROS Generierung durch die Verschiebung des Fluoreszenzsignals zu beobachten. Das bivariate Histogramm der Kontrolle lässt durch das Auftreten einer relativ dichten Zellwolke eine homogene Granularitäts- und Fluoreszenzverteilung der Zellpopulation erkennen, die sich infolge der belastungsbedingten (DQ12, 1h, 40 µg/cm<sup>2</sup>) Granularitäts- wie Fluoreszenzerhöhung ausdünnert. Die Verteilung der Messsignale wird durch die Partikelphagozytose und die quarzinduzierte ROS Generierung inhomogener. Im Vergleich zeigen die, auf einen Messparameter (DHR-Fluoreszenz) beschränkten univarianten FL1-Height(DHR)-Histogramme der Kontrolle und der 40µg/cm<sup>2</sup> Belastung die Verschiebung und Verbreiterung des Maximum der Fluoreszenzintensität durch die DQ12 Exposition.

Der aus den Histogrammen ermittelte Median FL1-Height(DHR, *Abb. 3.4.1.1.2*, unten links) erhöht sich in Abhängigkeit zur Quarzdosis (DQ12, 1h, 40 µg/cm<sup>2</sup>), sodass sich bei der hohen Dosis eine signifikante intrazelluläre ROS Generierung ermitteln ließ. Der durchflusszytometrisch bestimmte DHR-Umsatz, der als Positivkontrolle eingesetzten Inkubation der NR8383 Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1h, 200µM), zeigt eine sehr hohe, weit über der des Quarzes liegende, signifikante Induktion der intrazellulären ROS Produktion (*Abb. 3.4.1.1.2*, unten rechts).



**Abb. 3.4.1.1.2:** Repräsentative bivariate FSC/SSC(Forward/Side-Scatter-Angle)- und SSC/FL1-Height (Side-/Fluoreszenz1, DHR)- sowie univariate SSC- und FL1-Height-Histogramme (oben) der Kontrolle und der 40 µg/cm<sup>2</sup> DQ12-Belastung (1h). Abbildung der ermittelten Erhöhung des Median FL1Heights (Mittelwert ± SEM; n=3; \*≡ p<0,05, \*\*\*≡ p<0,001) für eine 1h Belastung von NR8383 Zellen mit DQ12 (unten rechts; 10, 40 µg/cm<sup>2</sup>) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1h, 200µM; unten links; Positivkontrolle).

Die Messergebnisse der Bestimmung der Gesamt(intra- +extrazellulär)-ROS-Bildung, durch die Umsetzung des Lucigenins mit gebildeten Radikalen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) zu dem, im blauen Wellenlängenbereich emittierenden Luminol, sind in *Abb. 3.4.1.1.3* dargestellt. Die repräsentative Abbildung, der am Luminometer über 1h simultan zur Quarzbelastung (0, 10, 40µg/cm<sup>2</sup>, in HBSS<sup>(+/+)</sup>) an NR8383 Zellen zu den verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommenen Einzelwerte, zeigen den kurvenförmigen Verlauf der Luminolemission, mit bei ca. 1000s auftretenden Maxima (links). Infolge der Quarzbelastung kommt es zu einer dosisabhängigen Verschiebung des Kurvenverlaufs zu höheren Emissionswerten. Die aus der Mittelung der Einzelwerte bestimmte Lumineszenz in % der Kontrolle (rechts) zeigt die bei 40µg/cm<sup>2</sup> signifikante DQ12 induzierten ROS Generierung.



**Abb. 3.4.1.1.3:** Repräsentative Einzelmesswerte der zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgenommenen Chemilumineszenz (20 Messungen/1h, alle 3min; links) und die daraus ermittelte Lumineszenz in % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3; \* $\equiv$  p<0,05; rechts) zur Bestimmung der Radikalgenerierung in Proben der Kontrolle (0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) sowie nach DQ12-Belastung (10 und 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 1h).

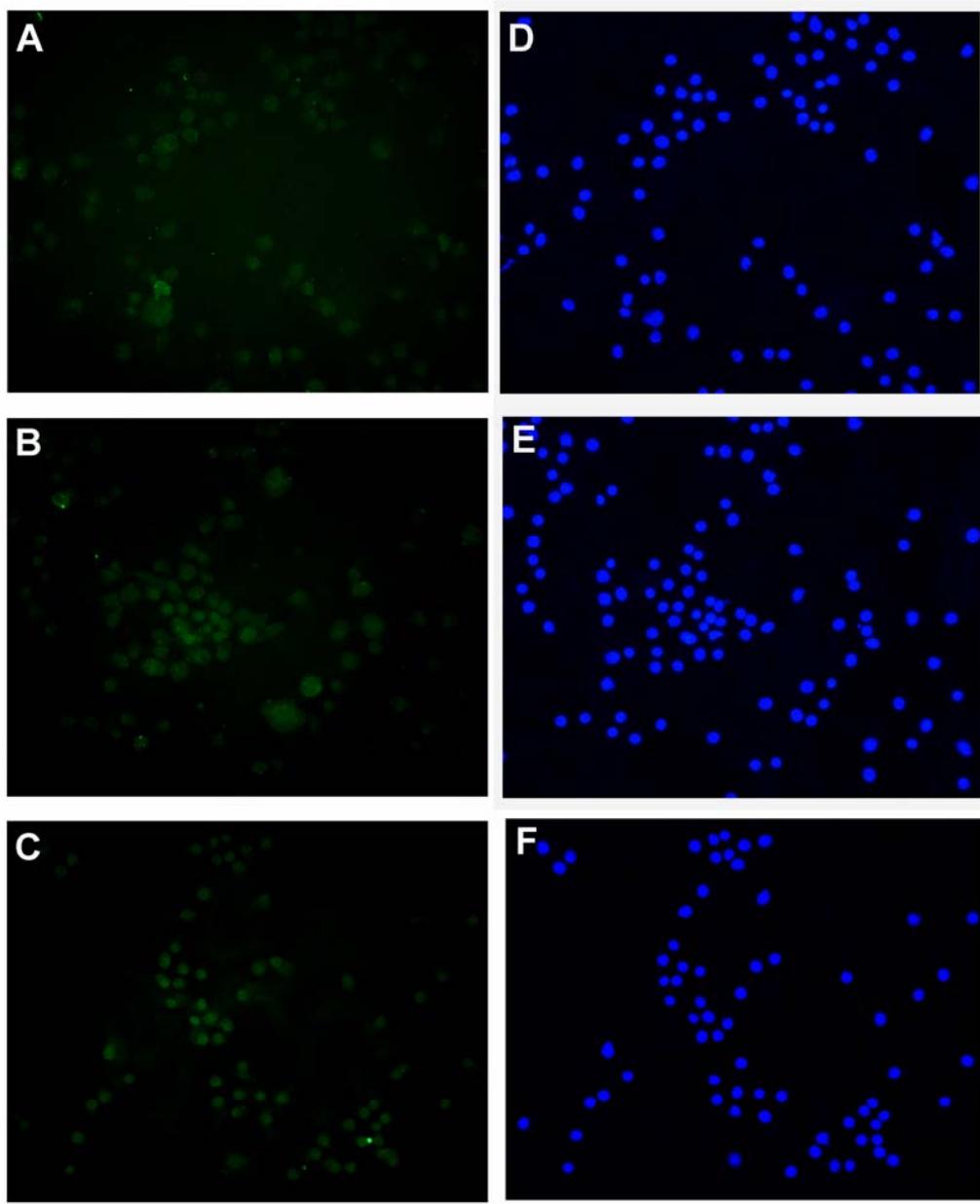
Durch alle drei Methoden konnte die DQ12-dosisabhängige ROS Generierung beobachtet werden. Die geringste Sensitivität scheint dabei jedoch die Lumineszenzmethode aufzuweisen. Konnte durch die ESR-Spektroskopie und Durchflusszytometrie eine, wenn auch nicht signifikante, ROS-Generierung nach einer 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Belastung gemessen werden, zeigt sich im Luminol-Assay bei dieser Quarzkonzentration keine Erhöhung der Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle. Sie wurde daher für die folgenden Studien der ROS-Generierung nicht mehr einbezogen.

### 3.4.1.2 Die DQ12 induzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges

Die in Kapitel 3.4.1.1 in NR8383 Zellen nachgewiesene quarzinduzierte, dosisabhängige ROS Generierung ist im Zusammenhang mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beschrieben. Dabei wird der zytosolständige NF- $\kappa$ B durch die Phosphorylierung und Dissoziation der inhibitorischen Untereinheit I $\kappa$ B- $\alpha$  aktiviert, sodass das p50/p65-Dimer in den Zellkern translokalisiert wird, während I $\kappa$ B- $\alpha$  proteasomal degradiert wird (Kapitel 1.1.3, Castranova 2004). Die Quarzinduzierbarkeit dieses Prozesses in NR8383 Zellen sollte nun über zwei Methoden untersucht werden.

Der erste, immunhistochemische Ansatz gab einen ersten Hinweis auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B. In den Abbildungen von Zytospinpräparationen der Doppelfärbung der NF- $\kappa$ B-p65-Untereinheit und DAPI, zeigen die Zellen nach DQ12-Belastung (1h, 10 und 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) eine Verschiebung des Transkriptionsfaktors vom Zytosol in den Nukleus (Abb. 3.4.1.2.1). Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen der NF- $\kappa$ B-p65-Färbungen (links) lassen, durch die Verlagerung der Fluoreszenzintensität von der Kontrolle (A) über die Belastung der Zellen mit 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (B) bzw. 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (C) diese Translokalisierung vom Zytosol in den Nukleus erkennen. Dabei zeigt die Belastung mit der geringen Quarzdosis im Vergleich zur Kontrolle fast keine, die mit der hohen Dosis dagegen eine klare Verlagerung Fluoreszenzintensität in

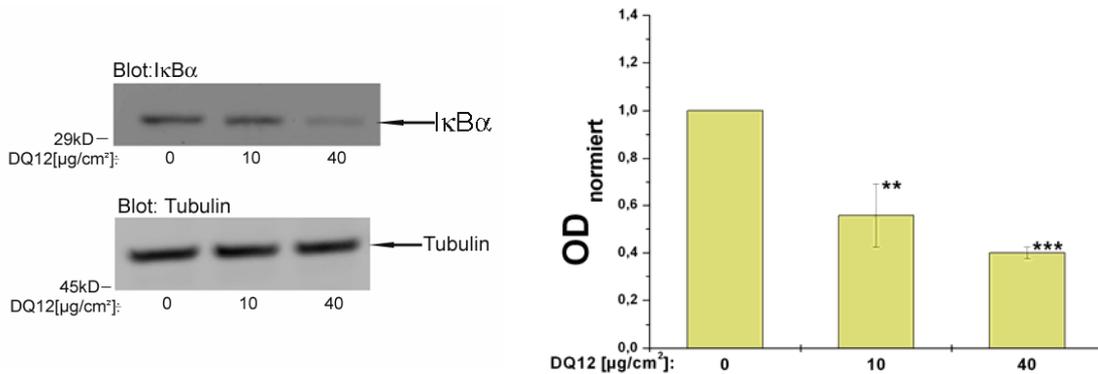
den Nukleus. Die Kernaussmaße sind anhand der Aufnahmen der DAPI-Färbungen zu erkennen (rechts; D, Kontrolle; E,  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; F,  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; 1h DQ12).



**Abb. 3.4.1.2.1:** Abbildung mikroskopischer Fluoreszenzaufnahmen (original Vergrößerung: x 1000) einer NFκB-p65(488nm, links)- / DAPI(rechts)-Doppelfärbung von Zytospinpräparationen unbelasteter (A, D) und 1h mit einer Quarzkonzentration von  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (B, E) und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (C, F) belasteter NR8383 Zellen.

Die Färbung gibt jedoch nur einen ersten subjektiven Eindruck. Zur objektiveren Analyse der NF-κB Aktivierung wurde in einer Western-Blot-Analyse die Degradierung der inhibitorischen Untereinheit IκB-α untersucht. Dabei erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung zytosolischer Zelllysate DQ12-belasteter (1h, 10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) NR8383-Zellen die Detektion

der Degradierung der inhibitorischen Untereinheit I $\kappa$ B- $\alpha$  durch einen spezifischen Antikörper (Abb. 3.4.1.2.2).

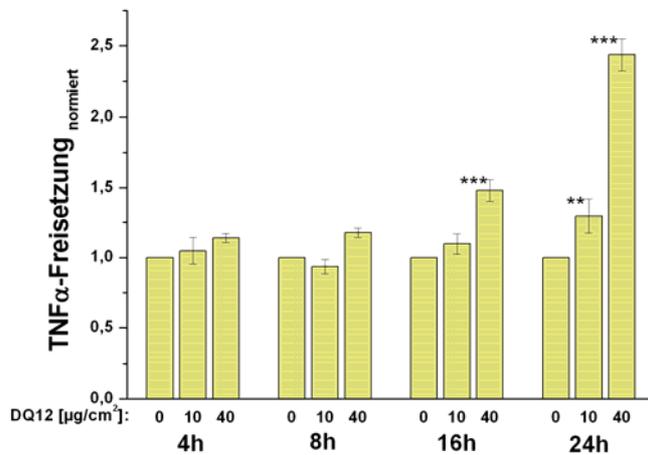


**Abb. 3.4.1.2.2:** Repräsentativer Western Blot (links; Detektion: I $\kappa$ B- $\alpha$ -spezifischen- bzw. Tubulin-Erstantikörper/anti-Kaninchen bzw. -Maus Zweitantikörper, Markerbanden bei 29kD bzw. 45kD) und Abbildung densitometrische Auswertung der optischen Dichten relativ zur Ladekontrolle (rechts; Mittelwerte normiert auf die Kontrolle  $\pm$  SEM; n=4; \*\*  $\equiv$  p<0,01, \*\*\*  $\equiv$  p<0,001) der elektrophoretischen Auftrennung (12% SDS-Gel) zytosolischer Lysate un- und belasteter (1h; 10, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12) NR8383 Zellen zur Untersuchung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Degradierung.

In der repräsentativen Western Blot Abbildung (links) lässt die sich abschwächende I $\kappa$ B- $\alpha$ -Bandeintensität bei 35kD, unter gleich bleibender Bandenintensität der Ladekontrolle ( $\beta$ -Tubulin, 50kD), die Degradierung des Proteins im Zytosol erkennen. Die Darstellung der densitometrischen Quantifizierung (rechts), bei der die ermittelten optischen Dichten der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Banden auf die des  $\beta$ -Tubulins relativiert und auf die Kontrolle normiert wurden, zeigt eine dosisabhängige, bei beiden Quarzdosen signifikante Reduktion des Signals. Somit konnte die DQ12 induzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B über den Abbau des zytosolständigen I $\kappa$ B- $\alpha$  gezeigt werden.

### 3.4.1.3 Die DQ12 induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$

Nun wurde exemplarisch, für die Freisetzung und Bildung pro-inflammatorischer Zytokine, die durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B erfolgen sollte, die TNF- $\alpha$  Konzentration im Zellüberstand an DQ12 (10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) belasteten NR8383 Zellen nach 4, 8, 16 und 24h untersucht (Abb.3.4.1.3.1). Die durch einen ELISA-Assay bestimmten, auf die Kontrollen normierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Zellüberständen zeigen eine sowohl dosis- als auch zeitabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach 16 und 24h. Nach geringeren Belastungszeiten (4, 8h) war keine signifikante TNF- $\alpha$ -Freisetzung nachzuweisen. Dagegen erhöht sich die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand nach einer 16h Belastung mit 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , sowie mit 10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nach 24h Exposition, signifikant. DQ12 induziert also wie erwartet eine dosisabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung.



**Abb.4.1.1.3.1:** Dosisabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch NR8383 Zellen nach Belastung mit DQ12 (10 und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) über 4, 8, 16 und 24h in den Zellüberstand. Aufgetragen ist die in mittels ELISA-Assays ermittelte auf die Kontrollen normierte Menge an freigesetzten TNF- $\alpha$  als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3; \*\*  $\equiv$  p<0,01, \*\*\*  $\equiv$  p<0,001).

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass DQ12 die ROS Generierung, sowie die Aktivierung des NF- $\kappa$ B, und die TNF- $\alpha$ -Freisetzung in NR8383 Zellen induziert. Diese drei verschiedenen pro-inflammatorischen Reaktionen der Makrophagenzelllinie auf die Quarzbelastung scheinen, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, mechanistisch miteinander gekoppelt zu sein. Die ROS-Generierung bewirkt demnach die NF- $\kappa$ B-Aktivierung, was zur Bildung von TNF- $\alpha$  führt. Es stellt sich jedoch nun die Frage, welche Rolle die DQ12-Aufnahme selbst und die an der Phagozytose der DQ12-Partikel beteiligten Mediatoren (z.B. Aktin und Fc $\gamma$ RII) in diesem Mechanismus spielen. Die Zusammenhänge zwischen der Partikelaufnahme und der pro-inflammatorischen Reaktion auf die Partikelexposition soll im Folgenden an der Untersuchung der Aktin- und Fc $\gamma$ RII-Abhängigkeit der ROS Bildung sowie der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aufgeklärt werden.

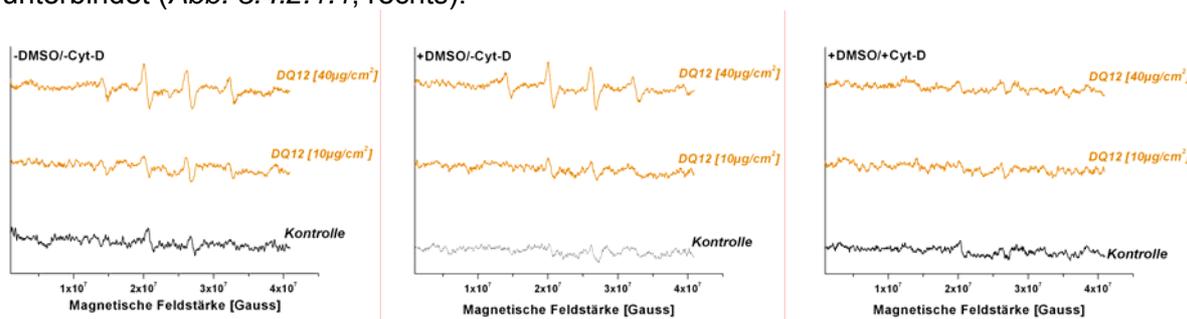
### 3.4.2 Rolle des Aktinzytoskeletts in der pro-inflammatorischen Reaktion auf DQ12 in NR8383 Zellen

In Kapitel 3.2 wurde in der inhibitorischen Aufnahmestudie mit Cyt-D gezeigt, dass die Quarzaufnahme von der Aktinkomponente des Zytoskeletts abhängig ist. Nun sollte in einer weiteren Untersuchung mit Cyt-D, der Einfluß der Partikelaufnahme bzw. des Aktins auf die DQ12 induzierte pro-inflammatorische Reaktion durch die Analyse der ROS Generierung, sowie der TNF- $\alpha$ -Freisetzung ermittelt werden.

#### 3.4.2.1 Die Rolle des Aktins in der DQ12 induzierten ROS Generierung

Um eine Aussage über die Abhängigkeit der DQ12 induzierten ROS Generierung von der Aktin Komponente des Zytoskeletts machen zu können, wurde diese nach der Inhibition mit Cyt-D ESR-spektroskopisch, sowie durchflusszytometrisch untersucht.

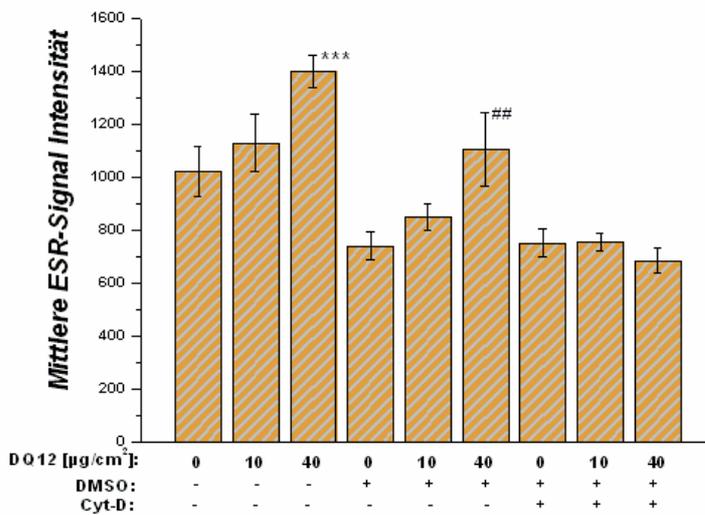
Die ESR-spektroskopische Analyse der extrazellulären ROS Bildung erfolgte, unter Verwendung von DMPO an NR8383 Zellen in HBSS<sup>(+/+)</sup> ohne oder nach Vorinkubation mit Cyt-D (1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30min) oder DMSO (0,75%, 30min) gefolgt von der DQ12 Belastung (1, 3h; 10 und 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). In den repräsentativen ESR-Spektren der Ansätze ohne Inhibition (Abb. 3.4.2.1.1, links) ist zunächst wieder die DQ12 dosisabhängige Verstärkung der Signale bei magnetischen Feldstärken von  $1,5 \times 10^7$ ,  $2,1 \times 10^7$ ,  $2,65 \times 10^7$  und  $3,25 \times 10^7$  Gauß zu beobachten. Die Inkubation mit dem Cyt-D-Lösungsmittel DMSO (Abb. 3.4.2.1.1, mitte), scheint keinen Einfluss auf die Intensität der ausgebildeten Signale zu haben, wohingegen die Aktininhibition, durch die Inkubation mit Cyt-D, die Ausbildung von Signalen nahezu unterbindet (Abb. 3.4.2.1.1, rechts).



**Abb. 3.4.2.1.1:** Repräsentative ESR-Spektren aufgenommen nach einer 1h DQ12 Belastung mit steigender Dosis (0, 10, 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ohne und unter Inkubation mit DMSO (0,75%, Cyt-D Solvenz) oder Cyt-D (1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

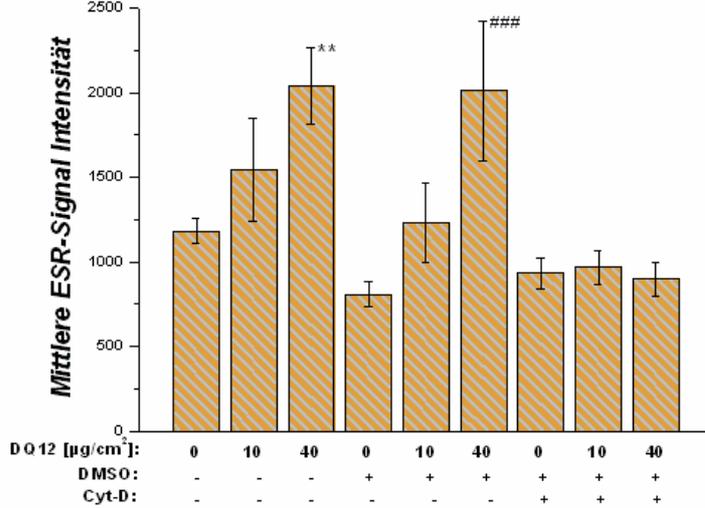
Die aus den, jeweils nach einer 1h und 3h Messung, ermittelten mittleren ESR-Signalintensitäten zeigen die DQ12-dosisabhängige ROS Bildung sowohl durch die nicht als auch durch die DMSO vorbehandelten Zellen. Nach der Belastung über 1h wie 3h bei der hohen Quarz-Dosis (40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (nicht oder DMSO vorbehandelte Zellen ohne Quarzbelastung) zeigt diese Signifikanz (Abb. 3.4.2.1.2). Dennoch scheint die Vorinkubation mit DMSO eine leichte, wenn auch nicht signifikante

Absenkung der ROS-Generierung im Vergleich zur nicht vorbehandelten Zelle, besonders nach der Quarzbelastungszeit von 1h, zu bewirken, was den Radikalscavenger Eigenschaften des Lösungsmittels zuzuschreiben sein könnte. Im Gegensatz dazu wird durch die Aktininhibition die quarzinduzierte ROS-Bildung vollständig (auf Kontrollniveau) unterdrückt. Weder nach der 1h, noch nach 3h Belastung mit bei beiden Quarzdosen zeigen sich signifikante Unterschiede zur entsprechenden Kontrolle (mit Cyt-D vorbehandelte Zellen ohne DQ12 Belastung). Ein weiterer statistischer Vergleich zwischen der Belastung mit und ohne Aktininhibition konnte eine signifikante Inhibition der ROS Bildung zeigen. Die quarzinduzierte extrazelluläre ROS-Bildung ist demnach von der Partikelaufnahme oder von der Funktionalität des Aktinzytoskelett abhängig.



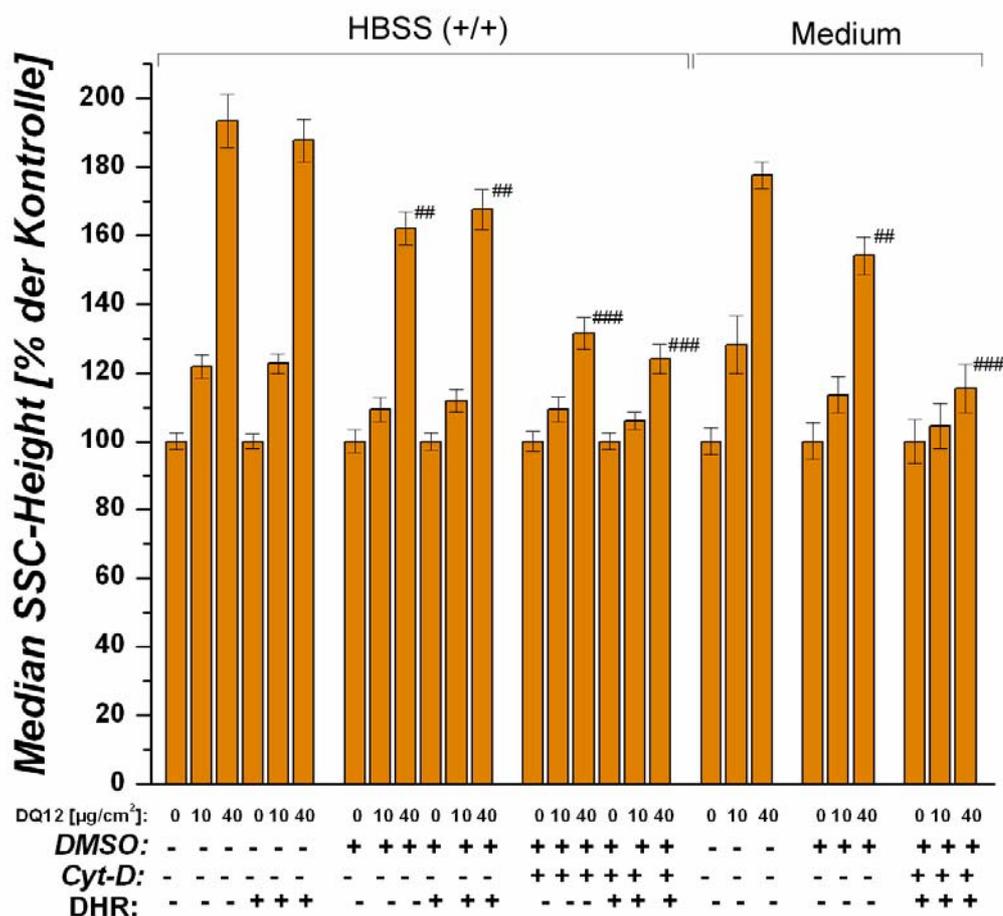
**Abb. 3.4.2.1.2:** Die aus den ESR-Spektren ermittelten mittleren ESR-Signal Intensität (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5, mit \*  $\equiv$  signifikante Induktion im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen, #  $\equiv$  signifikante Induktion im Vergleich zu DMSO vorbehandelten Zellen, mit \*\*, ##  $\equiv$  p<0,01, \*\*\*, ###  $\equiv$  p<0,001) nach einer DQ12 Belastung (10; 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) über 1h (oben) und 3h (unten) ohne und nach Inkubation mit DMSO (0,75%) oder Cyt-D (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

3h DQ12-Belastung



Bei der durchflusszytometrische Methode, die den Vorteil einer Mehrparameterstudie bietet, wurde simultan zur intrazellulären ROS-Generierung über die Rhodamin-Fluoreszenz, die Partikelaufnahme durch den SSC untersucht. Dies ermöglicht zum einen beide Parameter miteinander in Verbindung zu bringen und andererseits das Partikelaufnahmeverhalten unter

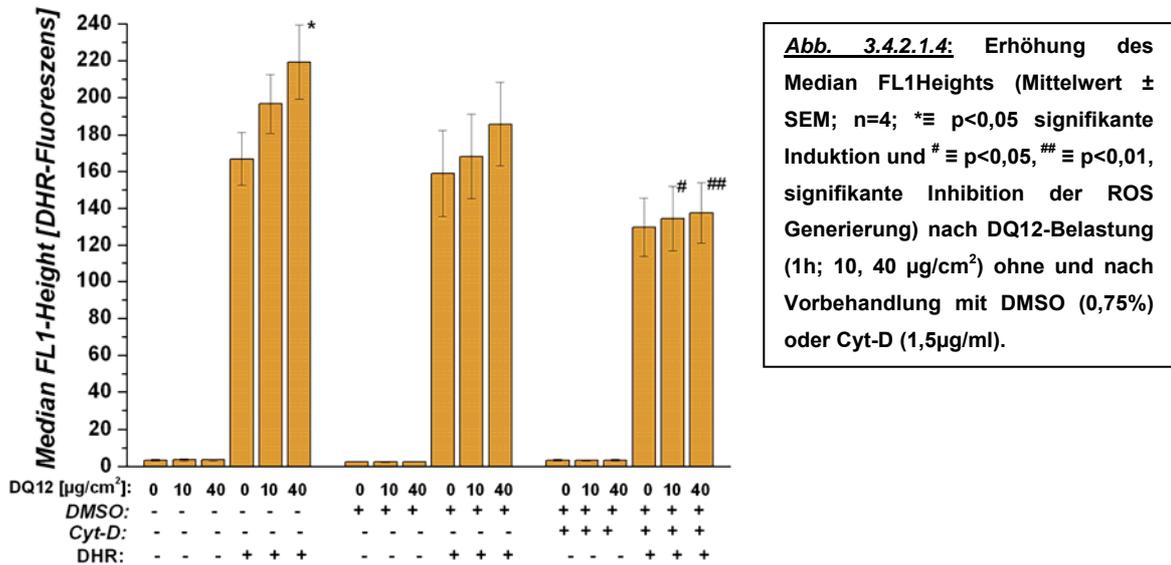
den zur Messung der ROS Generierung eingeführten experimentellen Bedingungen zu überprüfen. Die Messung der ROS-Bildung erforderte den Wechsel der Belastungsumgebung, da Mediumskomponenten als Radikalfänger wirken können, die die Assay-Sensitivität senken. Die Partikelbelastung und -aufnahme erfolgte daher in HBSS<sup>(+/+)</sup> anstelle von Medium, was zur Veränderung der Quarzphagozytoserate führen könnte. Doch wie sich aus der Untersuchung der Partikelaufnahme (Belastung mit DQ12; 1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>; ohne und mit Cyt-D- bzw. DMSO-Inkubation) an NR8383 Zellen in Medium oder HBSS<sup>(+/+)</sup> mit und ohne DHR-Zugabe ergibt, wurde weder die DQ12 Aufnahme noch die Inhibition durch den Austausch des Mediums mit HBSS<sup>(+/+)</sup> oder die Zugabe von DHR signifikant beeinflusst (Abb. 3.4.2.1.3).



**Abb. 3.4.2.1.3:** Ermittelter Median SSC (Mittelwert in % der Kontrolle ( $\equiv 100\%$ )  $\pm$  SEM; n=3; ##  $\equiv$  p<0,01, ###  $\equiv$  p<0,001 signifikante Inhibition der DQ12 Aufnahme) einer durchflusszytometrischen Messung an NR8383 Zellen nach Quarzbelastung (1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) ohne und unter DMSO (0,75%) bzw. Cyt-D (1,5mg/ml) Vorbehandlung in Medium oder HBSS<sup>(+/+)</sup> mit und ohne DHR Zugabe.

Die Durchflusszytometrische Analyse der ROS Generierung über die Messung des Median FL1Height (DHR-Fluoreszenz) an NR8383 Zellen in HBSS<sup>(+/+)</sup> nach DQ12-Belastung (1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) ohne und mit Cyt-D- bzw. DMSO-Vorbehandlung (Abb. 3.4.2.1.4), wurde

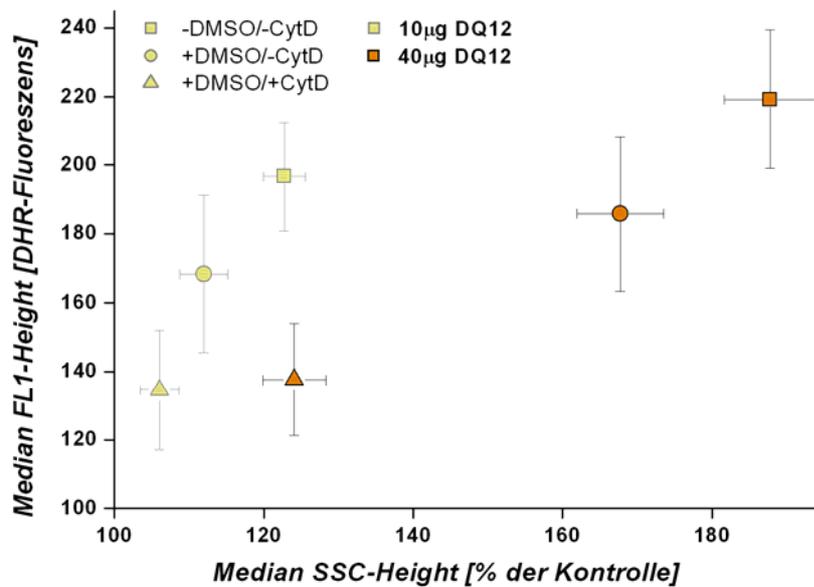
somit unter gleichen Aufnahmebedingungen wie zuvor in Medium durchgeführt (siehe Abb. 3.2.1.3).



**Abb. 3.4.2.1.4:** Erhöhung des Median FL1Heights (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4; \* $\equiv$  p<0,05 signifikante Induktion und #  $\equiv$  p<0,05, ##  $\equiv$  p<0,01, signifikante Inhibition der ROS Generierung) nach DQ12-Belastung (1h; 10, 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ohne und nach Vorbehandlung mit DMSO (0,75%) oder Cyt-D (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Die durch die Auswertung des detektierten Median FL1-Height(DHR), als Maß für das intrazellulär durch die Generierung von ROS umgesetzte DHR123, ermittelte DQ12-dosisabhängige Erhöhung der Fluoreszenz ohne Aktininhibition oder DMSO-Vorbehandlung zeigt bei einer Quarzkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Signifikanz. Eine zusätzliche DMSO-Inkubation führt, wie schon bei der ESR-Messung, zu einem nicht signifikanten Radikalscavenger Effekt. Des Weiteren bewirkt auch hier die Aktininhibition eine vollständige Unterdrückung der quarzinduzierten ROS-Bildung. Dabei wurde bei beiden Dosen gegenüber der nichtinhibierten Zelle eine signifikante Inhibition erreicht. Die Quarz induzierte intrazelluläre ROS-Generierung ist demnach von der Partikelaufnahme selbst abhängig oder ist ein Aktin-mediierter Prozess.

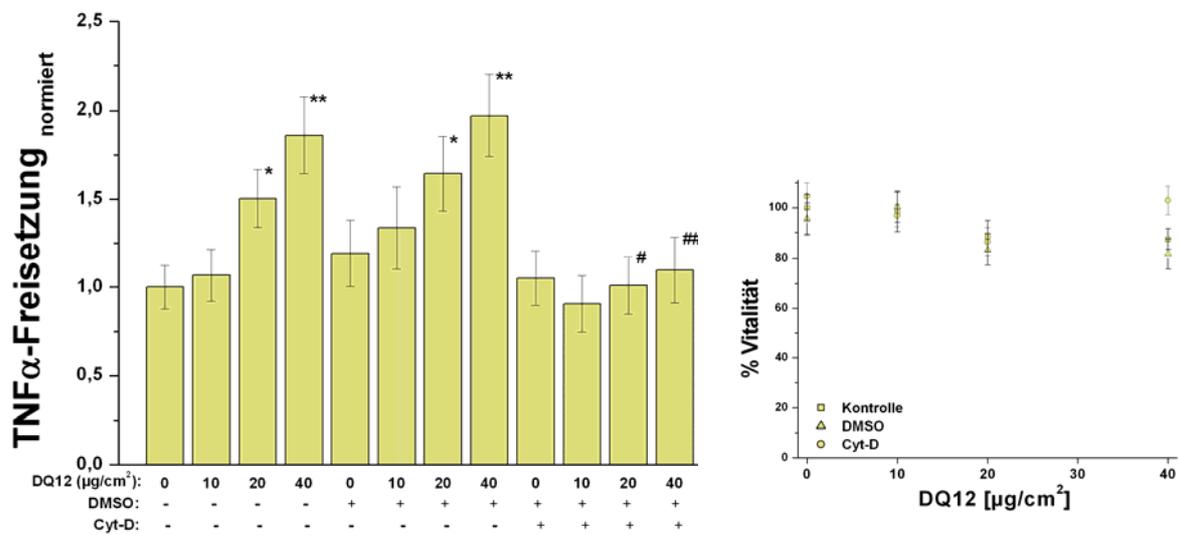
Dies kommt besonders im Korrelationsdiagramm (Abb. 3.4.2.1.5), das durch die Möglichkeit der durchflusszytometrischen Mehrparameteruntersuchung über die gleichzeitige Messung des Median FL1-Height(DHR) und des Median SSC erstellt werden konnte, zur Geltung. In diesem wurden die Mittelwerte des Median FL1-Height(DHR) gegen die des Median SSC für die verschiedenen Belastungskonzentrationen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  hell, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  dunkel) ohne Inhibition (Quadrat), nach DMSO-Vorbehandlung (Kreis) oder unter Aktininhibition (Dreieck) aufgetragen und über eine lineare Regression analysiert. Der ermittelte Regressionskoeffizient von 0,985 für die geringe (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und 0,996 für die hohe (40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Quarzdosis zeigt die gute Korrelation zwischen Partikelaufnahme und ROS-Generierung.



**Abb. 3.4.2.1.5:** Korrelation zwischen der Partikelaufnahme (Median SSC, Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4) und der ROS-Generierung (Median FL1-Height, Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4) nach einer 1h Belastung mit 10 (hell) und 40 (dunkel)  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit DQ12 ohne (Quadrate) und nach Vorbehandlung mit DMSO (Kreise) oder Cyt-D (Dreiecke). Eine lineare Regression ergab einen Regressionskoeffizienten von 0,985 für die geringe ( $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und von 0,996 für die hohe ( $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Quarzdosis.

### 3.4.2.2 Die Rolle des Aktins in der DQ12 induzierten Freisetzung von TNF- $\alpha$

Da die Aktin-regulierte oder partikelaufnahmeabhängige ROS-Generierung an der TNF- $\alpha$ -Freisetzung und -Bildung beteiligt sein sollte, wurde nun die Freisetzung dieses proinflammatorischen Zytokines in Abhängigkeit zur Funktionalität des Aktinzytoskeletts untersucht. Dabei erfolgte die Untersuchung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung mittels eines ELISA-Assays an Zellüberständen von NR8383 Zellen nach einer 24h Belastung mit DQ12 (10, 20 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) unter nicht toxischen Bedingungen (MTT-Assay, *Abb. 3.4.2.2.1, rechts*). Nach der Belastung der NR8383 Zellen ohne und unter DMSO Vorinkubation ergab sich eine dosisabhängige, bei DQ12-Dosen von 20 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikante, Erhöhung von TNF- $\alpha$  in den Zellüberständen (*Abb. 3.4.2.2.1, links*). Das Cyt-D-Lösungsmittel DMSO hat somit keinen Einfluss auf die zelluläre Zytokinabgabe. Die DQ12 induziert TNF- $\alpha$ -Freisetzung konnte dagegen durch die Inhibition des Zytoskeletts bei Quarzdosen von 20 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  signifikant auf das Kontrollniveau gesenkt werden. Damit sollte die TNF- $\alpha$ -Freisetzung entweder von der Funktionalität des Aktinzytoskeletts, von der Partikelaufnahme oder ROS-Generierung abhängig sein.



**Abb.4.1.1.3.1:** Mittels ELISA-Assays untersuchte dosisabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung (links, auf die Kontrolle ( $\equiv 1$ ) normierter Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3; \* $\equiv$  p<0,05, \*\*  $\equiv$  p<0,01 signifikante Induktion und #  $\equiv$  p<0,05, ##  $\equiv$  p<0,01 signifikante Inhibition der TNF- $\alpha$ -Freisetzung) durch NR8383 Zellen nach Belastung mit DQ12 (24h; 10, 20, 40 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) ohne und nach Vorbehandlung mit DMSO (0,75%) oder Cyt-D (1,5 $\mu$ g/ml). In einem MTT-Assay (rechts, Vitalität in % der Kontrolle; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3) ergab sich weder durch die DQ12 (10 und 40 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)-Belastung noch durch die Inhibition innerhalb der 24h Inkubation eine signifikante zelltoxische Wirkung.

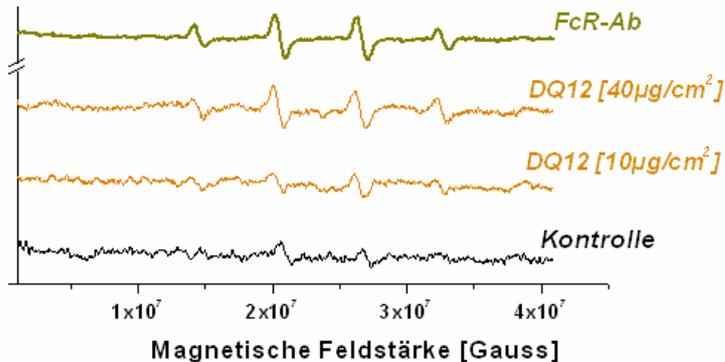
### 3.4.3 Rolle des FcγRII in der partikelinduzierten Entzündungsreaktion in NR8383 Zellen

In Kapitel 3.3 konnte der Einfluss des FcγRII auf die Quarzphagozytose gezeigt werden. Um nun die Rolle des FcγRII in der DQ12 induzierten Entzündungsreaktion zu analysieren sollte untersucht werden, ob durch den spezifischen FcγRII-Antikörper dieselbe ROS Generierung und TNF-α-Freisetzung induziert wird wie durch die Belastung mit Quarzpartikeln.

#### 3.4.3.1 Die Rolle des FcγRII in der DQ12 induzierten ROS Generierung

Der Vergleich der Induktion der ROS-Generierung durch die Inkubation mit dem FcγRII-Antikörper (1h; 1:200 verdünnt) oder den Quarzpartikeln (1h; 10, 40µg/cm<sup>2</sup>) erfolgte wieder mittels ESR-Spektroskopie und Durchflusszytometrie.

In den repräsentativen ESR-Spektren, welche zur Quantifizierung der extrazellulären ROS-Generierung durch die Messung der DMPO-Methylradikalbildung an NR8383 Zellen genutzt wurde, sind wieder Signale bei den magnetischen Feldstärken von  $1,5 \times 10^7$ ,  $2,1 \times 10^7$ ,  $2,65 \times 10^7$  und  $3,25 \times 10^7$  Gauß zu beobachten. Die Intensität erhöht sich zum einen nach der Quarzbelastung dosisabhängig und zum anderen durch die Inkubation mit dem FcγRII-Antikörper (Abb. 3.4.3.1.1).

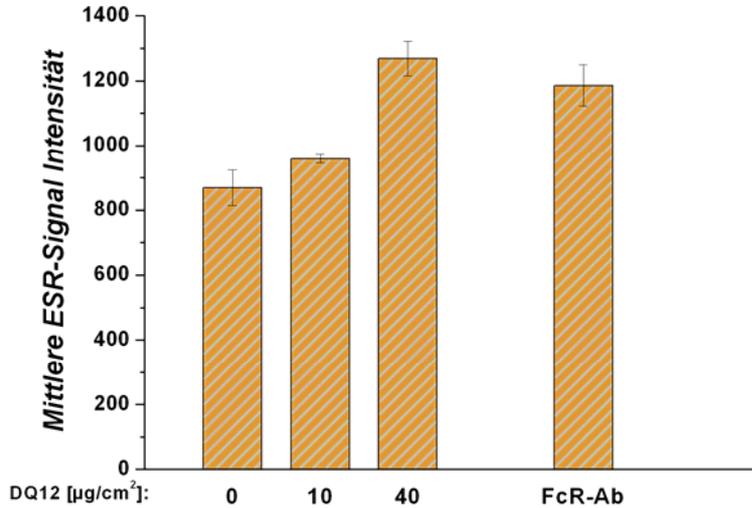


**Abb. 3.4.3.1.1:** Repräsentative ESR-Spektren der Messung des DMPO-Methylradikalprodukts nach der Belastung von NR8383 Zellen über 1h mit DQ12 (10, 40µg/cm<sup>2</sup>) oder dem FcR-Ab.

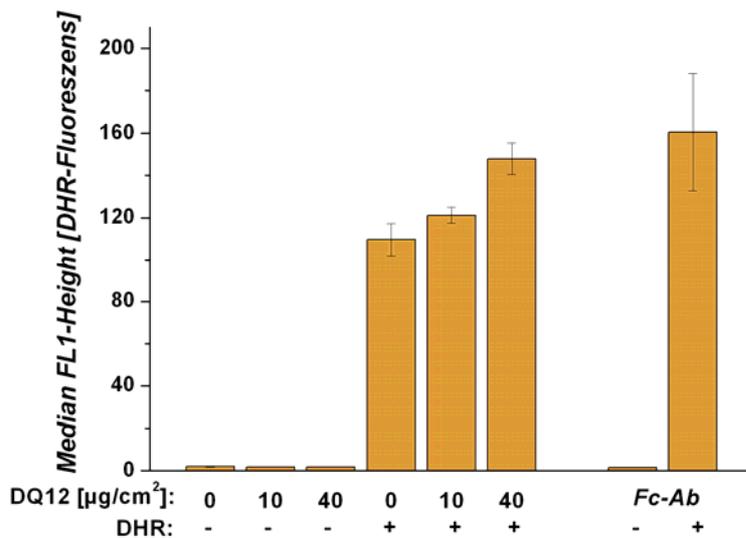
Die Auswertung der Spektren zeigte eine DQ12-dosisabhängige Erhöhung der mittleren ESR-Signal-Intensität, die bei der hohen Dosis (40µg/cm<sup>2</sup>) eine ähnliche Stärke aufweisen wie die FcγRII-Antikörper induzierte Radikalbildung (Abb. 3.4.3.1.2). Somit wird sowohl durch Quarz als auch durch den FcγRII-Antikörper eine extrazelluläre Bildung von ROS in ähnlicher Stärke induziert.

Die durch die Messung der Rhodamin-Fluoreszenz durchflusszytometrisch untersuchte intrazelluläre ROS-Generierung zeigt ein ähnliches Ergebnis (Abb. 3.4.3.1.2). Durch die Inkubation von NR8383 Zellen mit DQ12 oder dem FcγRII-Antikörper ist eine Verschiebung des Median FL1Height, der aus den bivarianten SSC-FL1- und univarianten FL1-Histogrammen bestimmt wurde, zu höheren Fluoreszenzintensitäten zu beobachten. Die so bestimmte intrazelluläre Bildung von ROS ist DQ12-dosisabhängig und nach Belastung mit

der hohen Quarzdosis ( $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) von etwa gleicher Stärke wie die FcγRII-Antikörper induzierte. Quarz und FcγRII-Ab induzieren zeitgleich eine intrazelluläre ROS-Generierung von gleicher Stärke.



**Abb. 3.4.3.1.2:** Darstellung der mittleren ESR-Signal Intensitäten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3) nach der 1h Belastung mit DQ12 (10,  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) oder dem FcR-Ab.

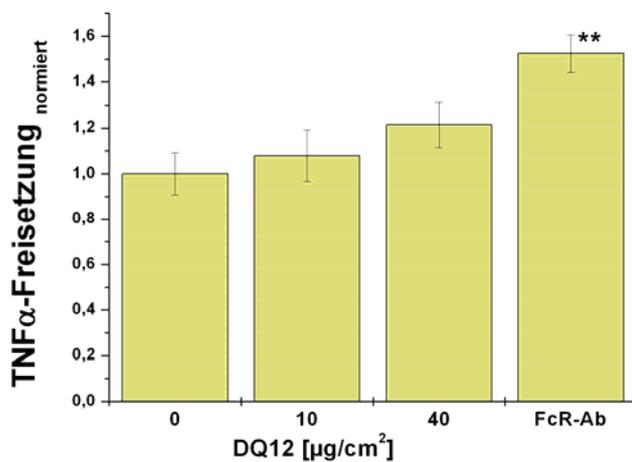


**Abb. 4.1.1.1.2:** Erhöhung des Median FL1Heights (DHR-Fluoreszenz; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3) durch eine 1h Belastung mit 10 und  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  DQ12 oder dem FcR-Ab.

### 3.4.3.2 Die Rolle des FcγRII in der DQ12 induzierten TNF-α-Freisetzung

Nach dem Vergleich zwischen der FcγR-Antikörper und Quarz induzierten ROS-Generierung, die mit der Freisetzung und Bildung von TNF-α in Verbindung gebracht wird, sollte nun der Effekt der spezifischen FcγR-Aktivierung durch den Antikörper im Vergleich zu der durch Quarz auf die Freisetzung des Zytokins untersucht werden.

Die durch einen ELISA-Assay ermittelten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Überständen DQ12 (4h; 10,40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) oder Fc $\gamma$ R-Antikörper (4h; 1:200 verdünnt) inkubierter NR8383 Zellen, zeigt sowohl eine quarzdosisabhängige, als auch Fc $\gamma$ R-Antikörper verursachte Zytokin-Freisetzung (Abb. 3.4.3.2.1). Zu diesem Belastungszeitpunkt ist allerdings nur die auf die Kontrolle normierte Fc $\gamma$ R-Antikörper induzierte TNF- $\alpha$ -Abgabe signifikant gegen die Kontrolle erhöht. Die Antikörper induzierte zelluläre Zytokinabgabe scheint somit schneller zu erfolgen als die durch DQ12. Es könnte also möglich sein, dass die quarzinduzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung über den Fc $\gamma$ R abläuft. Die Zeitverzögerung könnte darauf begründet sein, dass die Partikel zunächst opsoniert werden müssen, während der Antikörper direkt mit dem Rezeptor interagieren kann.



**Abb.4.1.1.3.1:** Dosisabhängige (DQ12 10, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und FcR-Ab induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung (ELISA-Assay, normierter Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3; \*\*  $\equiv$  p<0,01 signifikante Induktion) durch Inkubation von NR8383 Zellen über 4h.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die quarzinduzierte ROS-Generierung und TNF- $\alpha$ -Freisetzung abhängig von der Partikelaufnahme oder Aktin-vermittelt in ähnlichem Ausmaß wie die Fc $\gamma$ R-Antikörper verursachte Immunantwort abläuft.



---

## Kapitel 4: Diskussion

### 4.1 Biologische Relevanz der Modellpartikel (DQ12, CB, TiO<sub>2</sub>, SWNT's) und der Partikeldosis

#### 4.1.1 Modellpartikel-Relevanz

In dieser Studie wurden sowohl die schwerlöslichen Modellpartikel (PSP, poorly soluble particulates) CB fine ( $\varnothing$  0,26 $\mu$ m), CB ultra-fein (printex90,  $\varnothing$  0,014 $\mu$ m), TiO<sub>2</sub> fine ( $\varnothing$  0,26 $\mu$ m) und TiO<sub>2</sub> ultra-fein ( $\varnothing$  0,025 $\mu$ m) geringer Toxizität, wie auch das schwerlösliche DQ12 ( $\varnothing$  0,96 $\mu$ m) hoher Toxizität sowie technologisch hergestellte SWNT's ( $\varnothing$  0,001, Länge 1 $\mu$ m) verwendet. Diese Modellpartikel, wie auch die SWNT's zeichnen sich dadurch aus, dass sie innerhalb einer Population, im Gegensatz zu den z.B. durch Kollektoren gesammelten Umweltstäuben (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub>), homogene chemische und physikalische Eigenschaften (z.B. eine Komponente, gleichmäßige Größenverteilung) aufweisen und in zahlreichen Untersuchungen bereits genau charakterisiert wurden.

Bei den gesammelten Umweltpartikeln („realen“ Partikeln, z.B. PM<sub>2,5</sub>, PM<sub>10</sub>) dagegen, handelt es sich um komplexe Mischungen, aus vielen verschiedenen löslichen und unlöslichen Komponenten unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung, welche die unterschiedlichsten Effekte auf biologische Systeme haben können. So enthalten, die bei mechanischen Prozessen anfallenden PM<sub>10</sub>-Fraktionen (grobe, coarse  $\varnothing$  = 2,5-10 $\mu$ m) im Wesentlichen biologische Materialien wie Bakterien und Krustenmaterial (Erde, Meersalz). Die meist in Verbrennungsprozessen entstehenden feinen PM<sub>2,5</sub> ( $\varnothing$  = 0,1-2,5 $\mu$ m) und ultra-feinen PM ( $\varnothing$   $\leq$  0,1 $\mu$ m) bestehen dagegen im grundlegend aus einem Kern aus elementarem Kohlenstoff, der mit Metallen, Nitraten, Sulfaten und organischen Kohlenwasserstoffen ummantelt ist (Tao et al. 2003, Nel 2005). Allen drei Größenfraktionen werden Effekte, auf die Erhöhung der Risiken von Herz/Kreislauf- und Lungenerkrankungen zugeschrieben. Welche Fraktion jedoch die entscheidende ist, wird kontrovers diskutiert (Churg et al. 2000, Pope et al. 2002, Tao et al. 2003, Kappos et al. 2004). Einige Untersuchungen schätzen das von den PM<sub>2,5</sub> ausgehende Gesundheitsrisiko höher ein, andere beschreiben die PM<sub>10</sub>-Fraktion als die gefährlichere (Schwartz et al. 1996, Ostro et al. 1999, Pope et al. 2002). In weiteren Studien wird den ultra-feinen Partikelfraktionen ein hohes gesundheitsschädliches Potential zugeordnet (Wichmann et al. 2000, Oberdörster 2001). Eine an Hunden durchgeführte Inhalationsstudie mit CAP's (Concentrated Ambient Particles, 0,1-2,5 $\mu$ m, in speziellen Partikelkollektoren gesammelt) brachte eine Veränderung des Zellprofils im Blut, wie auch im respiratorischen Trakt der Versuchstiere hervor (Clarke et al. 2000). Zwei humane Inhalationstudien dagegen zeigten nach einer CAP's- oder PM<sub>2,5</sub>-Exposition nur die Induktion einer milden Entzündung im tieferen respiratorischen System, ohne

immunmodulatorische Auswirkungen in Blut oder Lunge (Ghio et al. 2000, Harder et al. 2001). Ex vivo (BAL-AM, Ratten) führte die Belastung mit groben PM-Fractionen (2,5-10 $\mu$ m) zu einer stärkeren Freisetzung inflammatorischer Zytokine als die mit einer feinen (IL-6 und TNF- $\alpha$ , Hetland et al. 2005). Des Weiteren konnte *in vivo* mit groben und feinen PM-Fractionen gezeigt werden, dass die Instillierung von groben im Gegensatz zu der mit feinen zu einer Entzündungsreaktion in der Lunge führt (Schins et al. 2004). Die Ermittlung der umweltmedizinischen Relevanz der verschiedenen Größenfraktionen wird zudem erschwert, da ihre Zusammensetzung und somit ihr pathogener Charakter mit geographischen, klimatischen und saisonalen Gegebenheiten, unter denen sie gesammelt wurden, variiert (Bonner et al. 1998, Frampton et al. 1999, Becker et al. 2005). Diese exemplarische Auswahl komplizierter und teilweise kontroverser Ergebnisse, zeigt die Problematiken, die sich aus der Untersuchung komplexer Umweltpartikel ergeben. Eine mechanistische Untersuchung der molekularen Vorgänge, die der pathologischen Wirkung der Umweltpartikel zugrunde liegen, wird durch diese Komplexität und Variabilität der „realen“ Partikelfractionen erschwert. Im Gegensatz dazu weisen die in dieser Studie eingesetzten Modellpartikel eine konsistente, homogene Zusammensetzung auf. Damit eignen sie sich besser für eine grundlegende mechanistische Untersuchung, deren Ergebnisse auch dazu dienen können Wirkungsweisen der „realer“ Umweltpartikel zu klären.

Ein weiterer Vorteil der Modellpartikel ist, dass sie als Fractionen mit einer bestimmten Größenverteilung gleicher physikalisch-chemischer Eigenschaften kommerziell erhältlich sind. Dabei sind sie in größeren Mengen erwerbbar und meist mit gleichen Eigenschaften nachlieferbar.

Zudem bieten Modellpartikel den Vorteil, dass in Folge zahlreicher bereits mit ihnen durchgeführter Untersuchungen, ein breites Wissen über ihre physikalisch-chemischen, toxikologischen und biologischen Parameter existiert. Für die meisten Partikel liegen Daten von grundlegenden Eigenschaften, wie z.B. die Größenverteilung, Oberflächenabmessung und Komposition vor, auf die zurückgegriffen werden kann und/oder die Vergleichsmöglichkeiten bieten. So sind z.B. Oberflächenabmessung, Komposition und Zelltoxizität verschiedener Quarzmodellpartikel, die zu Vergleichszwecke eingesetzt werden können, eingehend untersucht worden (Fenoglio und Fubini 2000, Clouter et al. 2001). Für die hier verwendeten DQ12-Partikel wurde bereits die Größenverteilung elektronenmikroskopisch ermittelt. Durch zahlreiche *in vitro* wie auch *in vivo* Studien existiert zudem ein großer Datensatz über die biologischen und toxikologischen Eigenschaften (z.B. Entzündungsfördernde Wirkung oder Karzinogenität) dieser Quarzpartikel (Borm et al. 2000, Knaapen et al. 2002, Albrecht et al. 2004, Albrecht et al. 2005). Dieser Datenkatalog bietet einerseits eine Vergleichsmöglichkeit und andererseits kann durch die Arbeit mit diesem

---

Partikel ein Beitrag zur Vervollständigung des Bildes über den pathogenen Charakter dieses geleistet werden.

Der Einsatz von Modellpartikeln ist weit verbreitet und wissenschaftlich anerkannt. So wurden Quarz-, CB-, und TiO<sub>2</sub>-Modellpartikel bereits von vielen Arbeitsgruppen verwendet, um die pathogene Wirkung von Partikeln grundlegend zu untersuchen. Unter anderem haben z.B. Driscoll und Mitarbeiter mit Modellpartikeln wie kristallinem SiO<sub>2</sub> und TiO<sub>2</sub> die pulmonalen Effekte dieser beiden Partikel *in vivo* an Ratten vergleichend untersucht (Driscoll et al. 1990 a, b). Eine andere Studie hebt unter Verwendung verschiedener Modellpartikel die unterschiedliche Stimulation des Immunsystems durch fibrogene Quarzpartikel im Vergleich zu nicht-fibrogenen TiO<sub>2</sub>-Partikeln hervor (Oghiso und Kubota 1987). Weitere Studien nutzen Modellpartikel, um den Einfluss der Größen, z.B. durch den Einsatz von CB und/oder TiO<sub>2</sub> verschiedener Oberflächenabmessungen (Renwick et al. 2004, Stroeger et al. 2006), unterschiedlicher Oberflächenmodifikationen, z.B. über die Untersuchung von TiO<sub>2</sub> oder SiO<sub>2</sub> mit verschiedenen Oberflächenummantelungen (Wahrheit et al. 2005, Albrecht et al. 2005) oder von Umweltmodulatoren wie z.B. Ozon oder Endotoxinen (Elder et al. 2000) auf den pathogenen Charakter einer partikulären Substanz zu untersuchen. Eine weitere Anwendung finden Modellpartikel in Vergleichsstudien, die sich mit der Expositionsmethode wie Inhalation oder Instillation (Wahrheit et al. 2005), oder der Interspeziesvarianz auf pulmonale Effekte in Ratten, Mäusen oder Hamstern (Bermudez et al. 2004) beschäftigen. Auch werden Modellpartikel dazu genutzt, um die pathogenen Auswirkungen der Exposition mit der „realer“ Partikel zu vergleichen. So wurden z.B. CB-Partikel (Ø = 100nm, 99% Kohlenstoff), DEP (Diesel Exhaust Partikeln, Ø = 400nm, 85% Kohlenstoff) und UAM (Urban Ambient Particulate Matter, Ø = 2µm, 15% Kohlenstoff) in einer vergleichenden Studie untersucht (Don Porto Carera et al. 2001). In einer anderen Studie wurde die partikelinduzierte Immunantwort durch die Exposition mit Umweltpartikeln im Vergleich zu α-Quarz als pathogene Positivkontrolle und TiO<sub>2</sub> als inerte Negativkontrolle untersucht (Stringer und Kobzik 1998). Von großer Bedeutung ist ebenso der Einsatz von Modellpartikeln zur Untersuchung von molekularen Mechanismen, wie z.B. der Partikel induzierten Signalkaskade, die zur NF-κB-Aktivierung (Hubbard et al. 2002, Albrecht et al. 2004), Apoptose (Iyer et al. 1996, Thibodeau et al. 2003) oder Proliferation (Albrecht et al. 2002, Tamaoki et al. 2004) führt. Des Weiteren haben Modellpartikel seit langem einen großen Stellenwert in der mechanistischen Untersuchung der Partikelaufnahme an Makrophagen und anderen Zelltypen gewonnen (Kolb-Bachhoven 1992, Kobzik 1995, Camner 2002, Geiser 2005).

Der Einsatz von Modellpartikeln eignet sich also besonders für mechanistische Studien, da sie eine konsistente Größen- und Komponentenverteilung aufweisen, deren Eigenschaften bekannt sind. Dies ermöglicht eine Studie, die durch viele Untersuchungen mit dem gleichen

Partikel (in großen Mengen erhältlich) zu umfassenden und reproduzierbaren Resultaten führen kann. Auf der anderen Seite sind die Modellpartikel (feines und ultrafeines CB- und TiO<sub>2</sub>- sowie Quarz-Partikel) allerdings auch nicht zufällig gewählt, sondern besitzen, da sie ebenso real in der Umwelt vorkommen, eine umweltmedizinische Relevanz. Sie sind unter anderem Komponenten der Umweltstäube (PM), die durch Industrie, Landwirtschaft oder natürliche Prozesse emittiert werden.

Die gesundheitlichen Risiken, die von kristallinen Silikatpartikeln ausgehen sind vor allem aus der Arbeitsmedizin bekannt. Wie schon in Kapitel 1.1.2 eingehend beschrieben, konnte ein Zusammenhang zwischen der chronischen Exposition von Arbeitern gegenüber Quarzstäuben, z.B. im Berg-, Straßen- oder Tunnelbau, und der Entwicklung von Silikose oder Krebs festgestellt werden. Der karzinogene Charakter von kristallinen Silikaten wurde von der IARC (International Agency for Research on Cancer) 1997, durch die Einstufung als Klasse-I-Karzinogen, festgehalten (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1997). Des Weiteren wurde 1996 durch die US Environmental Protection Agency (EPA) auf die, von der Quarzexposition ausgehenden, umweltgesundheitlichen Risiken hingewiesen. Von der Agentur wurden dabei die nichtarbeitsbedingten Risiken berücksichtigt, die sich vor allem auf nichtkarzinogene Gesundheitsbeeinträchtigungen beziehen (EPA, 1996). Silikate sind in der Natur in Gestein und Erde weit verbreitet und werden natürlich oder industriell (z.B. Landwirtschaft und Bergbau) in die Umwelt freigesetzt. Dabei reichern sie sich auch in den Umweltstäuben an. Messungen in den USA zeigten Quarzkonzentrationen von 3 bis 8 µg/m<sup>3</sup> in urbanen Gebieten (Davis et al. 1984). Eine Studie in Rom ergab eine Quarzverteilung in den PM von 1,7-3,4%, was einer Konzentration von 0,6-1,5 µg/m<sup>3</sup> entspricht (Puledda et al. 1999). Dies erscheint bei einer typischen Umweltpartikelkonzentration von 10-45 µg/m<sup>3</sup> für PM<sub>10</sub> und 10-30 µg/m<sup>3</sup> für PM<sub>2,5</sub> (jährliches Mittel) bzw. von 50-200 µg/m<sup>3</sup> für PM<sub>10</sub> und 40-150 µg/m<sup>3</sup> für PM<sub>2,5</sub> (maximaler täglicher Mittelwert) von nur sehr geringer Bedeutung. Jedoch verbleiben Silikatstäube lange im Körper, sodass sie sich anreichern und zu Langzeitschädigungen führen können (Churg und Brauer 2000, Brauer et al. 2001, Kappos et al. 2004).

Auch CB-Partikel wurden zunächst in der Arbeitsmedizin untersucht. Von der IARC wurden sie 1996 als Klasse 2B Karzinogen (mögliches Humankarzinogen) eingestuft, da zwar Hinweise für krebserregende Eigenschaften aus Tierstudien vorlagen, diese jedoch nicht ausreichend mit humanen Daten unterstützt werden konnten (IARC 1996). Seit 2006 gilt für CB allerdings eine Einstufung als Klasse 3 Karzinogen (nicht als humanes Karzinogen klassifizierbar, IARC 2006). In der feinen (PM<sub>2,5</sub>) wie auch in der ultra-feinen Fraktion der Umweltpartikel machen CB-Partikel einen großen Anteil aus. Sie entstehen z.B. bei Verbrennungsprozessen fossiler Brennstoffe oder werden, wie Quarzpartikel, durch den Bergbau freigesetzt. Zudem entstehen sie in der Reifenindustrie und werden bei der

---

Herstellung und Benutzung von Druckertonern an die Umwelt abgegeben (DHFS, Departement of Health & Family Service 2003).

Auch die vielfach als Negativkontrolle postulierten TiO<sub>2</sub>-Modellpartikel sind in der Umwelt zu finden. So werden industriell erzeugte TiO<sub>2</sub>-Partikel, die bisher als nahezu inert und gesundheitlich unbedenklich galten, in großen Mengen z.B. als Farbpigmente und Bindemittel genutzt. Doch zeigen gerade neuere Studien, dass auch diese Partikel ein gesundheitliches Risikopotential bergen. So konnte z.B. in einer subchronischen Inhalationsstudie mit ultra-feinem TiO<sub>2</sub> in Mäusen und Ratten eine Entzündungsreaktion sowie eine toxische Partikelwirkung gezeigt werden (Bermudez et al. 2004). Im Vergleich zeigen dabei ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel eine stärkere Entzündungsinduktion als feine TiO<sub>2</sub>-Partikel (Renwick et al. 2004). TiO<sub>2</sub> ist daher seit neuestem von der IARC als mögliches Karzinogen (Klasse 2B Karzinogen, IARC 2006) eingestuft. Dies ist besonders problematisch, da TiO<sub>2</sub>-Partikel aus der Kosmetik- (z.B. Sonnecreme, Lippenstift, Babykörperpuder), Lebensmittel- (z.B. Kaugummis), Farbstoff- und Pharmaindustrie nicht mehr wegzudenken sind. Auch ein Großteil von Implantaten besteht aus diesem Werkstoff.

Im Allgemeinen gewinnen gerade ultra-feine Partikel in neuerer Zeit in der toxikologischen Forschung zunehmend an Beachtung, da sich für sie im Zuge der Entwicklung der Nanotechnologie immer breitere Anwendungsbereiche ergeben. Heute bereits haben sie z.B. Verwendung in der Elektronik-, Sport- und Kosmetikindustrie gefunden und sollen zukünftig auch in der Medizin für Diagnose und Therapie (z.B. Drug delivery) eingesetzt werden (Nel et al. 2006). Ebenso könnten, die ebenfalls in dieser Studie untersuchten, SWNT's ihren Einzug in die molekulare Biomedizin halten.

Die für diese Studie gewählten Modellpartikel zeigen in verschiedenen Perspektiven der Partikelforschung eine Relevanz. Durch die Wahl von DQ12, feinem als auch ultra-feinem TiO<sub>2</sub> und CB, sowie der SWNT's als Untersuchungsobjekt lassen sich relevante mechanistische Untersuchungen durchführen, die zur Klärung von Fragen zum Gesundheitsrisiko z.B. von Umwelt- oder Arbeitsplatzstäuben führen und des weiteren auch den neu entstandenen nano-technologischen Bereich abdecken.

#### **4.1.2 Partikeldosis-Relevanz**

In Tier- und Humanstudien werden je nach Expositionsmethode und Versuchsobjekt häufig Dosen im mg- (Instillierung) oder µg/m<sup>3</sup>-(Inhalation) Bereich eingesetzt (Tabelle 4.1.2.1). Diese Belastungen sind weitaus geringer als die Partikeldosen (10 bis 80µg/cm<sup>2</sup> bzw. 30µg/ml in der SWNT), die in dieser Studie *in vitro* für die Belastung, sowohl von primären alveolaren und interstitiellen Makrophagen als auch von NR8383 Zellen verwendet wurden. Durch eine Arbeitsplatz bedingte Exposition können solche Belastungsdosen zwar erreicht werden, allerdings ist die Umweltbelastung zu den verschiedenen Partikeln (Quarz, CB), unter Berücksichtigung der Konzentrationen der verschiedenen Komponenten in den

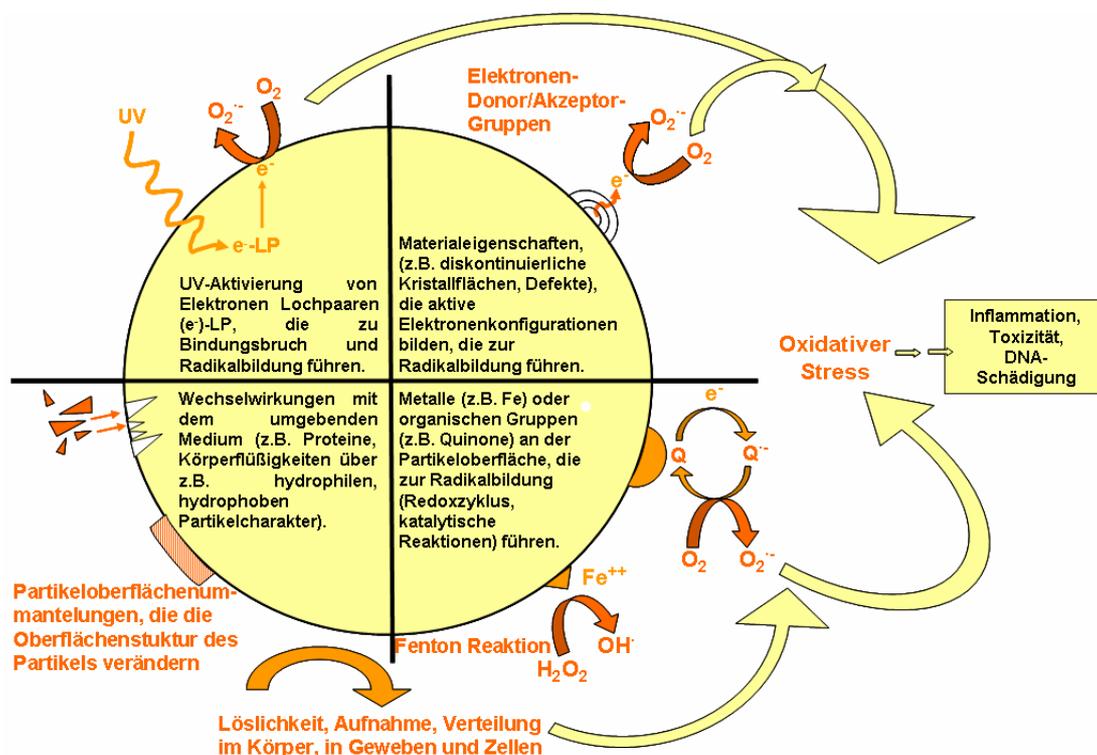
Umweltpartikeln (siehe Kapitel 4.1.1), weitaus niedriger als die hier eingesetzten Partikeldosen. Die gewählten Dosen sind aber zu tolerieren, da es sich um eine mechanistische Studie handelt, in der signifikante Effekte nach relativ kurzen Expositionszeiten erzielt werden sollen. In den Versuchen wurde die gewünschte Signifikanz meist mit der  $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Dosis erzielt. Eine, wenn auch nicht signifikante Dosisabhängigkeit, konnte durch den zusätzliche Einsatz der geringen  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Dosis gezeigt werden. Die gewählten Dosen sind somit ausreichend um signifikante Resultate zu erzielen, liegen dabei aber noch innerhalb oder sogar unterhalb des Konzentrationsbereichs, der in vielen anderen *in vitro* Studien zum Einsatz kam (Tabelle 4.1.2.1). Zudem wurde nach der Ermittlung der Zelltoxizität (siehe Kapitel 3.1) darauf geachtet, dass in einem nicht zelltoxischen Dosenbereich gearbeitet wurde. Die Versuche mit DQ12 und SWNT's wurden ausschließlich, die mit den anderen Stäuben (CB, fein und ultra-fein;  $\text{TiO}_2$ , fein und ultra-fein) hauptsächlich im nicht zelltoxischen Bereich durchgeführt. Nur die Aufnahmeuntersuchung an CB (fein und ultra-fein) und  $\text{TiO}_2$  (fein und ultra-fein) erfolgte mit  $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$  im toxischen Bereich, da sich im Fall des ultra-feinen CB bei geringeren Konzentrationen keine Partikelaufnahme verfolgen ließ. Des weiteren ist anzumerken, dass sich in der Lunge z.B. nach Exposition zu Quarz oder anderen PSP's so genannte Hot spot's bilden, in denen es in einem Gewebereich durch Akkumulation der Partikel zu einer Anreicherung von hohen Partikelkonzentrationen kommen kann.

Expositionsdosis	Partikel	Studien-Spezies	Belastungszeit	Expositions-Methode	Referenz
<b>in vitro</b>					
10, $40\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\approx 30, 116\mu\text{g}/\text{ml}$	DQ12; f und uf CB, $\text{TiO}_2$ ; SWNT's	Primäre AM und IM, Ratte NR8383 Makrophagen	1, 2, 3, 4, 24h	-	-
133 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,	Quarz (kristallin, amorph), $\text{TiO}_2$	Primäre AM, Human	24h	-	Iyer et al. 1996
125,45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 78 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	CB, $\text{TiO}_2$ , fein und ultra-fein	J774.2 Makrophagen	4, 8, 24, 48h	-	Renwick et al. 2000
30,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	CB, f und uf	Primäre Lungenepithelzellen, Human	24, 48, 72h	-	Tamaoki et al. 2004
12,5; 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$\alpha$ -Quarz	alveolare Makrophagen Zelllinie (MH-S), Maus	6, 12, 24h	-	Thibodeau et al. 2003
<b>in vivo</b>					
5-100mg/kg	$\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$	Ratte	-	Instillierung	Driscoll et al. 1990
2mg/Tier	DQ12	Ratte	-	Instillierung	Albrecht et al. 2004
5,20,50 $\mu\text{g}/\text{Tier}$	CB, f und uf	Maus	-	Instillierung	Stoeger et al. 2006
2-10mg/kg 1130-1300mg/m <sup>3</sup>	$\text{TiO}_2$	Ratte	4 w	Instillierung Inhalation	Wahrheit et al. 2005
0,5; 2,0; 10 mg/m <sup>3</sup>	$\text{TiO}_2$ , ultra-fein	Maus, Ratte, Hamster	6h/5d/ 13w	Inhalation	Bermudez et al. 2003

**Tab. 4.1.2.1:** Eingesetzte Quarzkonzentrationsbereiche verschiedener *in vivo* und *in vitro* Studien.

## 4.2 Partikeltoxizität. Toxikologische Betrachtung der Partikeleigenschaften.

Die zelltoxische Wirkung der untersuchten Partikel (CB, TiO<sub>2</sub> fein und ultrafein, Kapitel 3.1.1) auf die NR8383 Makrophagenzelllinie zeigt, dass den ultra-feinen Partikelfractionen im Vergleich zu den feinen Partikeln des gleichen Typs eine stärkere Zelltoxizität zuzuordnen ist. Diese hohe zelltoxische Wirkung der ultra-feinen (nano) Partikel (<100nm, 0,1µm) wird allgemein auf das große Verhältnis von Oberflächen zu Massen zurückgeführt. Durch die geringe Größenausdehnung ist bei gleicher Masse die Anzahl der Partikel besonders hoch. In Umweltpartikeln z.B. findet man in 10µg/m<sup>3</sup> Umweltstaub pro ml Luft 2.390.000 Partikel mit einem Durchmesser von 0,02µm, die eine Oberfläche von 3000µm<sup>2</sup> aufweisen. Der Partikel wie auch der Oberflächenanteil verringert sich dagegen drastisch, wenn Partikel einer Größe von 0,5 oder 2µm (auf 153 bzw. 2 Partikel/ml Luft; auf 120 bzw. 30 µm<sup>2</sup>/ml Luft) betrachtet werden. Besonders relevant wird das Verhältnis von Größe zu Oberfläche, wenn Atome und Moleküle auf der Partikeloberfläche betrachtet werden. Diese Oberflächenstrukturen (z.B. Metallummantelungen, Elektronendonator- bzw. Elektronenakzeptorgruppen, hydrophile oder hydrophobe Gruppen), die in *Abb. 4.2.1* zusammengefasst sind, bestimmen den physikalisch-chemischen Charakter der Partikel und beeinflussen deren Wirkung auf biologische Systeme (oxidativer Stress, Partikel Aufnahme). Das Verhältnis der Atome oder Moleküle auf der Partikeloberfläche steigt dabei mit sinkender Partikelgröße exponentiell an, wodurch sich die Partikeleffekte verstärken (Oberdörster et al. 2005, Nel et al. 2006).



**Abb. 4.2.1:** Oberflächenreaktivitäts beeinflussende Parameter (z.B. Metallummantelungen, Elektronendonator/Akzeptorgruppen oder Hydrophilie), die die Partikeleffekte (Oxidativer Stress, Partikel Aufnahme) auf biologische Systeme beeinflussen (verändert aus Nel et al. 2006).

Die ultra-feinen Partikel weisen also durch die große Oberfläche eine höhere Zahl möglicher reaktiver Gruppen auf als ihre größeren Äquivalente, wodurch sich die Effekte auf biologische Systeme verstärken. Dies konnte hier anhand der Partikeltoxizität (fein < ultra-fein) gezeigt werden. Dabei führt die Untersuchung des Partikeleinflusses (Kapitel 3.1.1) auf die Vitalität der NR8383 Zellen jedoch zu einem Toxizitätsprofil ( $DQ12 \approx TiO_2 \text{ (fein)} > CB \text{ (fein)}$ ), welches von der grundsätzlichen toxikologischen Einstufung ( $DQ12 > TiO_2 \text{ (fein)} < CB \text{ (fein)}$ ) abweicht. Dies soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Zelltoxizität wird von der Größe, chemischen Komposition, Oberflächenstruktur, Löslichkeit, Form und dem Aggregatzustand der Partikel beeinflusst, was sich unter anderem in der unterschiedlichen Toxizität der Partikel bemerkbar macht. Als verantwortlich für diese Varianz in der Toxizität werden dabei verschiedene Mechanismen postuliert.

So wurde beispielsweise in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) gezeigt, dass  $TiO_2$  eine geringere Toxizität aufweist als Quarz (Hart und Hesterberg 1998). Im Gegensatz dazu zeigt  $TiO_2$  in dieser Studie eine ähnliche (fein) oder sogar höhere Zelltoxizität (ultra-fein) als der Quarz, was möglicherweise an der höheren Aufnahmekapazität der Makrophagen für  $TiO_2$ -Partikel liegen könnte. Die Untersuchung der Partikelaufnahme (Kapitel 3.1.2) zeigt, dass  $TiO_2$ -Partikel beider Größenfraktionen in einem weitaus höheren Maß aufgenommen werden als DQ12-Partikel. Die mikroskopischen Aufnahmen der 4 und 24h Belastung lassen schon bei einer Dosis von  $10\mu g/cm^2$  erkennen, dass die  $TiO_2$  belasteten Makrophagen völlig mit Partikel ausgefüllt sind, wohingegen in den Quarz belasteten NR8383 Zellen nur einzelne Partikel zu finden sind. Diese Überladung der Makrophagen mit  $TiO_2$ -Partikeln könnte die Vitalfunktionen (z.B. Stoffwechsel, Atmungskette) herabsetzen und zu der beobachteten Herabsetzung der Zellvitalität führen. Die DQ12-Belastung bewirkt keine solche Überladung der Makrophagen und die Zelltoxizität würde von anderen Faktoren bestimmt. Eine Inhalationsstudie an Ratten konnte zeigen, dass die Exposition gegenüber hohen Dosen  $TiO_2$ , neben der Induktion einer pulmonaren Entzündung und der erhöhten Lungenzellenproliferation auch zu einer verminderten Makrophagenfunktion führt, die mit einer Reduktion der Partikel-Clearance einhergeht (Wahrheit et al. 1997). Mit der Verminderung der Makrophagenfunktion zeigt sich in den Ratten eine pulmonale  $TiO_2$ -Toxizität, die im Einklang mit der in Kapitel 3.1.2 gemessenen hohen Toxizität der  $TiO_2$ -Partikel steht. Die hohe Toxizität der  $TiO_2$ -Partikel könnte demnach von einer Partikelüberladung der Makrophagen hervorgerufen sein.

Gegen die Hypothese, dass eine Partikelüberladung der Makrophagen allein die hohe Zelltoxizität der  $TiO_2$ -Partikel bewirkt, spricht allerdings eine ähnliche Aufnahmezeit bei stark unterschiedlicher Zelltoxizität (ultra-fein >>> fein) von feinen und ultrafeinen  $TiO_2$ -Partikel in NR8383 Zellen. Der Aufnahmeeffekt dürfte also allein nicht ausreichen, um die unterschiedliche Zelltoxizität der feinen und ultrafeinen  $TiO_2$ -Partikel zu erklären. Eine

---

Partikel induzierte Radikalbildung könnte ein weiterer, an der zelltoxischen Wirkung des TiO<sub>2</sub> beteiligter Effekt sein, der die höhere Zelltoxizität des ultrafeinen Partikels erklärt. So konnte *in vivo* an Ratten nach der Instillierung von ultra-feinem TiO<sub>2</sub> ein zelltoxischer Effekt in Abhängigkeit vom oxidativen Stress gezeigt werden (Afaq et al. 1998). Wird zusätzlich zur Aufnahme die ROS-Bildung berücksichtigt, könnte, bedingt durch die verschiedenen Größen und der damit verbundenen größeren reaktiven Oberfläche der ultra-feinen Partikel, die TiO<sub>2</sub>-induzierte Zelltoxizität erklärt werden. Demnach würden ultra-feine TiO<sub>2</sub>-Partikel, infolge ihres höheren ROS-Bildungspotentials bei gleicher Aufnahmekapazität, eine stärkere zelltoxische Wirkung haben als feine. Um jedoch die Ursachen der hohen Zelltoxizität der beiden TiO<sub>2</sub>-Partikelfractionen genau bestimmen zu können, müssten sich weitere Untersuchungen wie z.B. der ROS Generierung anschließen.

Auch die Toxizität (Zelltoxizität wie auch Genotoxizität) des Quarzes wird in AM auf die reaktive Oberflächenstruktur und dem daraus resultierenden oxidativen Stress zurückgeführt (Zhang et al. 2000). Dabei zeigt sich ein Quarz dosisabhängiger zelltoxischer Effekt, der unter gleichzeitiger Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie der Senkung der Phagozytoserate von Latex-Beads auftritt (Balduzzi et al. 2004). Infolge der Expositionen gegenüber kristallinen Silikaten wird unter anderem, bedingt durch die reaktive Oberfläche, eine Reihe von Vorgängen angeregt, die zur zelltoxischen Wirkung führen könnten. Dabei scheint wieder die Aufnahme der Partikel oder zumindest die Wechselwirkung mit Oberflächenrezeptoren, die auch an der Aufnahme beteiligt sein könnten, ein entscheidender Faktor zu sein. So wird die durch Quarz induzierte Apoptose über die Inhibition des ScR, der bisher als Vermittler der Partikelaufnahme postuliert wird (Kobzik 1995), vollständig reduziert (Iyer et al. 1996). Eine andere Gruppe konnte jedoch zeigen, dass der ScR-Inhibitor Poly-I den Quarz induzierten Abfall des ATP-Levels als Maß für Zelltoxizität nicht beeinflusst. Dagegen ist die stärkere TiO<sub>2</sub> induzierte Senkung des ATP-Levels durch den Einsatz des Inhibitors zu unterbinden. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass TiO<sub>2</sub>-Partikel im Gegensatz zu SiO<sub>2</sub>-Partikeln zwar eine stärkere Reduktion des ATP-Levels bewirken, jedoch die Partikel induzierte LDH-Freisetzung nach der Belastung mit Quarzpartikeln höher ist. Dies weist auf einen unterschiedlichen Mechanismus der Zelltoxizität der beiden Partikel hin (Kim et al. 1999).

Im Fall der CB-Partikel scheint die Aufnahme die Zelltoxizität nicht entscheidend zu beeinflussen, da ultra-feines CB, welches in nur sehr geringem Maß durch NR8383 Zellen aufgenommen wird, die höchste Toxizität aufweist. Feines CB wird dagegen in ähnlicher Menge wie DQ12 aufgenommen, weist jedoch eine weitaus geringere Zelltoxizität auf. Allerdings wird auch bei CB-Partikeln, insbesondere der ultra-feinen Fraktion, die Auswirkungen auf biologische Systeme meist dem Partikel induzierten oxidativen Stress zugeschrieben (Donaldson et al. 2005). Damit könnte die hohe zelltoxische Wirkung des

ultra-feinen CB, im Vergleich zum feinen, auf eine durch die größere Oberfläche bedingte stärkere ROS-Bildung zurückgeführt werden. Ultra-feine CB-Partikel zeigen jedoch eine höhere Zelltoxizität als TiO<sub>2</sub>-Partikel der gleichen Größe, wohingegen feines CB eine geringere zelltoxische Wirkung hat als feines TiO<sub>2</sub>. Ursache hierfür könnte der bereits ausführlich diskutierte Einfluss der Aufnahme auf die zelltoxische Wirkung der TiO<sub>2</sub>-Partikel sein, der bei CB nicht auftritt.

SWNT's haben erst in den letzten Jahren durch die Entwicklung der Nanotechnologie Bedeutung erlangt. Langfristig sollen sie für pharmazeutische oder diagnostische Zwecke in der Medizin eingesetzt werden. Daher sind eine toxikologische Risikoeinschätzung sowie das Erlangen eines mechanistischen Verständnisses, der durch SWNT induzierten biologischen Effekte von besonderer Relevanz. *In vitro* führt die Exposition von Mäusen zu SWNT's zu der Bildung von Lungengranulomen (Lam et al. 2003). Im Vergleich dazu sind nach Exposition zu gleichen Dosen ultra-feinem CB oder feinem kristallinen Quarz keine solchen pathogenen Erscheinungen zu beobachten. Auch die durch die Belastung mit Quarz oder CB induzierte pulmonale Entzündung und Lungenschädigung ist geringer als die, die durch SWNT Instillation in C57BAL/6 Mäusen hervorgerufen wird (Shvedova et al. 2005). Gleiches ist auch in Ratten zu beobachten. Im Gegensatz zu den als Positivkontrolle eingesetzten Quarzpartikeln, deren Instillierung eine dosisabhängige Entzündung induziert, ruft die Exposition zu SWNT's eine dosisunabhängige Bildung von Granulomen hervor. Des Weiteren zeigt die Quarzbelastung zu allen Zeitpunkten nach der Instillierung (24h, 1 Woche, 1 und 3 Monate) zelltoxische Effekte in der Lunge, die durch SWNT's nur nach 24 h bei einer Dosis von 5mg/kg Tier verursacht werden (Wahrheit et al. 2004). SWNT's scheinen somit einen völlig unterschiedlichen pathogenen Charakter aufzuweisen als die anderen untersuchten Partikel. Es ist jedoch anzumerken, dass bei diesen Studien kontrovers über die Dosisrelevanz der verwendeten Belastungskonzentrationen (1-5mg/kg) diskutiert wird. Weiter ist unter Diskussion, ob die ermittelte pulmonale Toxizität der SWNT's durch den enthaltenen Metallanteil (z.B. Fe), der im Produktionsprozess entsteht, oder durch die SWNT's selbst verursacht wird (Colvin 2003, Nel et al. 2006). Um eine, unter anderem für die Zelltoxizität verantwortliche ROS-Generierung durch den Eisenanteil auszuschließen, wurde eine *in vitro* Studie mit eisenreichen und -armen SWNT's durchgeführt. Obwohl die eisenreichen SWNT's in einer zellfreien Lösung ein höheres Redoxpotential aufwiesen, konnte nach einer Belastung von Raw264.7 Makrophagen mit beiden SWNT-Aufreinigungsstufen intrazellulär keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nachgewiesen werden (Kagan et al. 2006). Das Eisen und das daraus resultierende höhere Redoxpotential scheinen also nicht für die Zelltoxizität der SWNT's verantwortlich zu sein. Eine weitere *in vitro* Studie ergab eine zelltoxische SWNT-Wirkung in alveolären Makrophagen nach einer 6h-Belastung mit Dosen > 11,3µg/cm<sup>2</sup>. Im Vergleich waren sie somit toxischer als MWNT10's (multi-wall nanotubes

---

mit 10-20nm Durchmesser) oder Quarz (Jia et al. 2005). Die Untersuchung der Zelltoxizität in dieser Studie dahingegen, die mit vergleichbaren Dosen ( $7,5\mu\text{g/ml} \equiv 2,6\mu\text{g/cm}^2$ ;  $15\mu\text{g/ml} \equiv 5,2\mu\text{g/cm}^2$ ;  $30\mu\text{g/ml} \equiv 10,4\mu\text{g/cm}^2$ , Kapitel 3.1.1) durchgeführt wurde, konnte keine solche Zelltoxizität zeigen. Eine signifikante zelltoxische Wirkung, mit einer Vitalitätsreduktion von etwa 25% trat bei den beiden höheren Dosen erst nach einer Belastungszeit von 16h auf. Dies könnte zum einen durch eine unterschiedliche SWNT-Aufbereitung, die entscheidend für die Eigenschaften der Nanotubes ist, oder zum anderen durch die Verwendung vermeidlich sensiblerer primärer Zellen hervorgerufen sein. Jedoch erwies sich auch in dieser Studie, die SWNT-Belastung im Vergleich zu einer Quarzbelastung ähnlicher Dosis und Belastungszeit (DQ12, 24h,  $10\mu\text{g/cm}^2$ , Vitalitätssenkung um 10%) als toxischer.

Die für die Zelltoxizität kritischen Wechselwirkungen zwischen Zelle und Partikel, die z.B. die ROS-Generierung induziert und/oder zur Partikelaufnahme führt, unterscheidet sich demnach von Partikel zu Partikel. Damit ist die unterschiedliche Zelltoxizität auf einen Partikel spezifischen Einfluss auf die Interaktion zwischen Partikel und Zelle zurückzuführen. Die Variabilität in den Effekten, die die Zelltoxizität begründen können, wiederum unterstützt die Hypothese, dass die partikelinduzierte Zelltoxizität auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen könnte. Zur Unterstützung dieser Hypothese sollten jedoch weitere Untersuchungen der Mechanismen der Zelltoxizität durchgeführt werden, was allerdings nicht Ziel dieser Studie sein sollte. Ziel der Untersuchung der Zelltoxizität war hier lediglich, die Ermittlung der nicht toxischen Partikeldosen und Belastungszeiten (für DQ12:  $10\text{-}40\mu\text{g/cm}^2$ , bis zu 24h; feines und ultra-feines CB als auch  $\text{TiO}_2$ :  $10\mu\text{g/cm}^2$ , bis zu 24h; SWNT's:  $30\mu\text{g/ml}$ , bis zu 8h) für die folgenden Belastungen zur Studie der Aufnahmemechanismen.

### **4.3 Die Partikelaufnahme unter Betrachtung der Heterogenität unterschiedlicher Makrophagenpopulationen und Partikeltypen.**

Nachdem gezeigt wurde, dass die Partikelcharakteristiken die zelltoxischen Eigenschaften bestimmen, wurde ihr Einfluss auf andere biologischen Funktionen, die sich aus der Wechselwirkung von biologischen Systemen mit Partikeln ergeben untersucht. Partikeloberflächeneigenschaften haben unter anderem Auswirkungen auf die zelluläre Aufnahme -aber auch auf die Verteilung der Partikel in Zellen, Geweben und Körper-, Proteinbindungen oder Proteinmodifikationen, welche Degradierungen, Denaturierungen und Veränderungen von Enzymfunktionen bewirken und pathogene Auswirkungen (z.B. ROS-Generierung, NF- $\kappa$ B-Aktivierung, DNA-Schädigung) haben können. Im Anschluss an die toxikologische Betrachtung der Partikeleigenschaften wurde die Aufnahme verschiedener Partikel durch unterschiedliche Makrophagenpopulationen untersucht.

#### **4.3.1 DQ12-Partikel-Aufnahme in primären AM und IM sowie in NR8383 Zellen. Heterogenität der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen.**

Nach erfolgreicher Etablierung der durchflusszytometrischen Analyseverfahren zur Untersuchung der Partikelaufnahme (Kapitel 3.1.2.1), konnte in einem Vergleich der Internalisierungsrate an primären alveolaren Makrophagen mit NR8383 Zellen gezeigt werden, dass die Zelllinie ein geeignetes *in vitro* Modell darstellt.

Aus der vergleichenden Studie der DQ12-Aufnahme in IM und AM, ergibt sich des Weiteren eine Heterogenität der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen. Die Aufnahme von DQ12 Partikeln scheint in IM geringer zu sein als in AM. Beide weisen dabei eine identische Größe auf, sodass der von Zetterberg et al. (1998) beschriebene Größenunterschied keine hinreichende Erklärung für dieses Resultat ist. Einen Größenunterschied weist nur die Zelllinie (NR8383) auf, die rund 40% größer ist als die primären Makrophagen. Somit könnte der Unterschied in der Aufnahme zwischen den IM und den NR8383 Zellen zu erklären sein, wobei die geringere Partikelaufnahme durch die IM auf eine geringere Wechselwirkungsmöglichkeit zwischen Partikel und Zelloberfläche zurückzuführen wäre. Dies wirkt sich besonders auf die Belastung mit hohen Dosen aus, da bei diesen Konzentrationen nicht das Zusammentreffen von Partikel und Zelle, sondern die Effizienz der Wechselwirkungen die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Dies erklärt aber nur einen Unterschied in der Aufnahme zwischen NR8383 und IM, nicht aber den zwischen den gleich großen IM und AM. Die Unterschiede in der Aufnahme sollten demnach durch weitere Parameter hervorgerufen werden. Ein Faktor könnte eine geringere Differenzierung der IM sein, da dieser Makrophagentyp häufig als Vorläufer der alveolaren Makrophagen angesehen wird (Bowden 1984). Ein anderer entscheidender Parameter für das unterschiedliche Aufnahmeverhalten könnte eine andere Spezialisierung der beiden

Makrophagenpopulationen, infolge ihrer gewebespezifischen Differenzierung in verschiedenen Umgebungen und andere Aufgabenbereiche, sein. Ein Vergleich humaner alveolarer und interstitieller Makrophagen konnte z.B. zeigen, dass sich AM und IM morphologisch in der Größe (IM<AM) wie auch in der Heterogenität (IM>AM) unterscheiden. Dabei weisen jedoch viele IM ein AM ähnliches Erscheinungsbild auf. Funktionell liegen signifikante Unterschiede in der phagozytotischen Aktivität (AM>IM) vor, bei der die AM sowohl eine schnellere Bindungs- als auch Aufnahmefähigkeit zeigen (Fathi et al. 2001). Die Phagozytose opsonierter, roter Schafsblutzellen, sowie die Abgabe von ROS erfolgt bei AM in einem stärkeren Maß als bei IM (Prokhorova et al. 1994). Des Weiteren weisen murine IM eine geringere Phagozytosekapazität zu Hefen (*S. cerevisiae*) auf und setzen nach der Exposition gegenüber LPS weniger TNF- $\alpha$  und ROS frei als AM. Dafür ist die LPS induzierte Bildung von IL-6 und IL-1 in IM stärker als in AM (Franke-Ullmann et al. 1996). Diese Ergebnisse implizieren eine unterschiedliche Funktionalität der beiden Makrophagenpopulationen, welche auf eine unterschiedliche gewebespezifische Spezialisierung zurückzuführen sein könnte. So sind AM in den Alveolen der Lunge hohen Konzentrationen an Sauerstoff und Umweltschadstoffen ausgesetzt. Sie müssen direkt auf körperfremde Eindringlinge reagieren. Dies bedarf einer hohen Phagozytosekapazität und der Freisetzung von ersten unspezifischen Abwehrstoffen wie ROS oder Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ ), die zur ersten Abwehr oder der Aktivierung des angeborenen Immunsystems dienen (Kapitel 1.2.2). Im Gegensatz dazu stehen die im Interstitium lokalisierten IM im engen Kontakt mit anderen Zellen. Neben der ersten Immunabwehr haben sie eine immunregulatorische Funktion, die sich in der Freisetzung größerer Mengen immunregulatorischer Zytokine wie z.B. IL-6 und IL-2 bemerkbar macht (Brain 1992, Iles und Forman 2002).

Die Unterschiede in der DQ12-Aufnahme in AM und IM könnte also auf eine unterschiedliche Funktionalität zurückzuführen zu sein. Diese Aussage sollte jedoch in weiteren Untersuchungen der Immunfunktion (TNF- $\alpha$ -, ROS- Freisetzung und Bildung, Membranoberflächenepitopen) der beiden Makrophagenpopulationen überprüft werden.

#### **4.3.2 DQ12-Parikel-Aufnahme in primären alveolaren Makrophagen isoliert von Tieren unterschiedlichen Alters. *Heterogenität des Alters.***

In einem weiteren Nebenprojekt wurde der Einfluss des Alters der Tiere auf die Phagozytosekapazität der isolierten AM untersucht. Es zeigte sich, dass isolierte AM von jüngeren Tieren eine ungefähr zweimal höhere DQ12-Aufnahmerate zeigen als die älteren Tiere. Weiter auffällig ist, dass von den jüngeren Ratten mit einem um 20% geringeren Körpergewicht (207g), die 3-fache Menge AM isoliert werden konnte als von den älteren Ratten mit höherem Gewicht (260g). Eine Erklärung hierfür könnte eine stärkere

Immunaktivität der jungen Tiere sein, deren Immunsystem möglicherweise noch in der Entwicklung ist.

Auch scheint das Alter eine entscheidende Rolle für die Gesundheitsrisiken durch die Partikelexposition zu spielen. An Ratten konnte eine Studie einen modulatorischen Alterseffekt in der Entzündungsreaktion nach Inhalation ultra-feiner CB-Partikel zeigen (Elder et al. 2000). Verschiedene epidemiologische Studien ergaben eine veränderte Sensitivität gegen Partikelexpositionen in verschiedenen Alterspopulationen (Schwartz J. 1994, Calderon-Garciduenas et al. 2000, Trasande und Thurston 2005).

Die erhöhte Aufnahmekapazität der von jüngeren Tieren isolierten AM könnte auf eine stärkere Aktivität des Immunsystems zurückzuführen zu sein. Doch Bedarf auch diese Aussage einer genaueren Analyse.

### **4.3.3 Aufnahme von Partikeln mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Parametern in NR8383 Zellen. *Biologische Relevanz der Partikeleigenschaften.***

Aus der Kombination der durchflusszytometrischen Messergebnisse mit den mikroskopischen Aufnahmen (Kapitel 3.1.2.3) konnte in NR8383 Makrophagen eine unterschiedliche Aufnahmekapazität für die verschiedenen Partikel gezeigt werden. Resultierend aus dieser Untersuchung ergibt sich, dass verschiedene Partikel von Makrophagen mit einer unterschiedlichen Kapazität aufgenommen werden, wobei die Größe weniger ausschlaggebend zu sein scheint als die Partikelart.

Kontrovers zu diesem Ergebnis steht die Aussage von Oberdörster et al. (2005) über die Aufnahme von Partikeln verschiedener Größe *in vivo*. Aus mittels BAL aus Ratten isolierten AM konnte 24h nach der *in vivo* Exposition gegenüber Partikeln mit Größen von 15-20nm; 80nm; 0,5µm; 3µm und 10µm, bis zu 80% der Partikel mit einer Größe von 0,5-10µm aber nur 20% der Partikel im Größenbereich von 15-80nm zurück gewonnen werden. Bei der Rückgewinnungsrate der Partikel aus dem Lungenepithel und Interstitium dagegen ergab sich eine umgekehrte Rückgewinnung. So konnten 80% der Partikel mit einer Größe kleiner als 80nm und nur 20% der Fraktionen größer 0,5µm aus dem Lungengewebe isoliert werden. Demnach würden AM ultra-feine Partikel nur geringfügig aufnehmen. Die *in vivo* an AM ermittelten Aufnahmeraten entsprechen sowohl denen der ultra-feinen CB-Partikel, wie auch der von feinem Quarz-, CB- und TiO<sub>2</sub>-Partikel in dieser Studie, stehen aber kontrovers zur extrem hohen *in vitro* Aufnahme von ultra-feinen TiO<sub>2</sub>-Partikeln durch NR8383 Zellen. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Oberdörster et al. (2005) und der hier an ultra-feinem TiO<sub>2</sub> durchgeführten Aufnahmestudie könnte unter anderem durch den Unterschied von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen erklärt werden. In der Tierstudie gelangen die Partikel nach der Instillierung in die Lunge. Große Partikel, die sich langsamer bewegen, können von den AM leicht erkannt und aufgenommen werden. Kleinere und sich schneller bewegende Partikel dagegen, werden von den AM nicht so schnell erfasst, sodass

sie bis zum Lungengewebe vordringen können. Hier können die ultra-feinen Partikel mit dem Epithel in Wechselwirkung treten und vom Lungenepithel und Interstitium aufgenommen werden, wodurch sie für die Makrophagen nicht mehr zugänglich sind. Dies erklärt das beschriebene Rückgewinnungsmuster in den BAL-Zellen und dem Lungengewebe. *In vitro* dagegen können die ultra-feinen Partikel den NR8383 Zellen nicht ausweichen und werden von ihnen aufgenommen. Dies erklärt die Aufnahme der ultra-feinen TiO<sub>2</sub>-Partikel, ergibt nun aber wiederum eine Kontroverse zur fast nicht stattfindenden *in vitro* Aufnahme der ultra-feinen CB-Partikel.

In einer *in vitro* Untersuchung der Aufnahme fluoreszierender Latex-Beads mit einer Größe von 1; 0,2 und 0,078µm konnte in pulmonalen Makrophagen gezeigt werden, dass ein Makrophagenanteil von 77% die ultra-feinen Partikel aufgenommen hat, während die 0,2µm Partikel nur von 21% und die 1µm Partikel von 56% der Makrophagen aufgenommen wurden (Geiser et al. 2005). Diese Untersuchung unterstützt einerseits die Ergebnisse dieser Studie, da das für verschieden große Latexbeads beschriebene Aufnahmeverhältnis mit dem von DQ12, feinem CB und ultra-feinem TiO<sub>2</sub> übereinstimmt. Andererseits ergeben sich komplementäre Ergebnisse zu den Partikelaufratmeraten in NR8383 Zellen. So werden ultra-feines CB und feines TiO<sub>2</sub> von NR8383 Makrophagen in einem weitaus tieferen bzw. höheren Maß aufgenommen. In einer weiteren *in vitro* Studie konnte dagegen ein ähnliches Aufnahmeverhältnis, wie das hier für feines TiO<sub>2</sub> und DQ12 beschriebene, gezeigt werden. So nehmen primäre AM (BAL) feine TiO<sub>2</sub>-Partikel (1-2µm) in einem stärkeren Maß auf als feinen α-Quarz (1-2µm, Kobzik 1995). Die hohe Aufnahmerate des TiO<sub>2</sub> im Vergleich zum DQ12 stimmt des Weiteren mit Befunden eines Tierversuchs überein, bei dem TiO<sub>2</sub> im Vergleich zu SiO<sub>2</sub> eine höhere Clearance, die hauptsächlich über die Partikel Aufnahme durch Makrophagen erfolgt, zugeordnet werden konnte (Driscoll et al. 1991).

Die geringere Aufnahme der ultra-feinen CB-Partikel könnte durch eine zellskelettoxische Wirkung des Partikels, die ähnlich wie die des Cyt-D zu einer Verminderung der Phagozytosekapazität führt, erklärt werden. Zwei Studien konnten eine verminderte Phagozytose von Latexbeads nach einer Exposition gegenüber feinen wie auch ultra-feinen TiO<sub>2</sub> und CB *in vitro* und *in vivo* zeigen (Renwick et al. 2001, Renwick et al. 2004). Eine weitere Untersuchung ergab ähnliche Effekte für eine Belastung von RAW 264.7 mit Quarz (Balduzzi et al. 2004). Mittels Zellmagnetometrie konnte in einer Untersuchung der Phagozytose sphärischer magnetischer Partikel (1,3µm) in Makrophagen nach der Behandlung mit Cyt-D, sowie mit ultra-feinen Partikeln eine ähnliche Zerstörung der für die Phagozytose essentiellen Mikrofilamente sowie eine verzögerte stochastische Phagosomenbewegung gezeigt werden (Möller et al. 2000, Möller et al. 2002). Die geringe Aufnahmekapazität der NR8383 Makrophagen für ultrafeine CB-Partikel könnte auf eine solche Zellskelettschädigung zurückzuführen sein. Dagegen spricht allerdings die hohe

Aufnahmerate von ultra-feinem TiO<sub>2</sub>, da diesem Partikeltyp in J774A.1 Makrophagen eine weitaus stärkere Mikrofilament zerstörende Wirkung zugeordnet wird (Möller et al. 2002). Da jedoch die eingesetzten TiO<sub>2</sub>-Partikel, wie auch die verwendeten Zellen nicht identisch sind, könnten in dieser Studie infolge anderer Wirkungsmechanismen verschiedene Zellskeletttoxizitäten auftreten.

Eine weitere Erklärung für die abweichende Aufnahmekapazität könnte sein, dass die ultra-feinen CB-Partikel aufgrund ihrer Struktur die Zellmembranen nicht so leicht passieren können oder bedingt durch andere Oberflächeneigenschaften, eine schlechtere Wechselwirkung zwischen Membranoberfläche und Partikel stattfindet als bei ultra-feinem TiO<sub>2</sub>. So scheint zumindest *in vitro* die Partikeloberfläche für die Aufnahmekapazität eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies spiegelt sich nicht nur in der unterschiedlichen Aufnahmekapazität für ultrafeines CB und TiO<sub>2</sub> wieder, sondern zeigt sich auch in Unterschieden bei der TiO<sub>2</sub>- und SiO<sub>2</sub>-Aufnahme. Ein Einfluss der Partikeloberflächen auf die Partikelaufnahme konnte in Untersuchungen mit Oberflächenmodifikationen gezeigt werden. In A-549-Zellen, wie auch in NR8383 Makrophagen verändert ein Oberflächen-Coating mit Aluminium-Lactat oder PVNO sowohl die Anzahl der phagozytotischen Zellen, wie auch die aufgenommenen Partikel pro Zelle (Schins et al. 2002, Albrecht et al. *subm.*). Eine Ummantelung von superparamagnetischen Nanopartikeln, die eine negativ geladene Oberfläche aufweisen, mit Albumin moduliert ebenfalls die Aufnahme in verschiedenen Zelllinien (Wilhelm et al. 2003).

Die Untersuchung der Aufnahme ist jedoch nicht nur von pathologischer Bedeutung, sondern auch relevant für die zuvor beschriebene biomedizinische Verwendung der Nanopartikel. Die Aufnahmemöglichkeiten der Nanopartikel, insbesondere der biotechnologisch erzeugten Nanotubes, durch biologische Systeme ist ein entscheidender Faktor für ihren Einsatz in Diagnose und Therapie (z.B. Drug delivery). Gerade in den letzten Jahren wurden daher mehrere Studien durchgeführt, die sich mit der Oberflächenbeschaffenheit von Nanopartikeln in Bezug auf die Aufnahme durch zelluläre Systeme beschäftigen. Auch hier wurde mit Oberflächenmodifikationen gearbeitet, allerdings um die SWNT's für die Aufnahmestudie detektierbar zu machen. So zeigen sich, z.B. in HL60 Zellen keine unterschiedlichen Aufnahmeraten zwischen SWNT's die mit Streptavidin oder BSA ummantelt wurden (Kam und Dai 2005). Einen Unterschied zu ungecoateten SWNT's konnte diese Studie allerdings nicht feststellen, da die Aufnahme von SWNT's aufgrund ihrer optischen Eigenschaften weder mikroskopisch noch durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Alternativ bietet sich die NIR-spektroskopische Methode, die von Cherukuri et al. (2004) zur Messung der SWNT-Aufnahme in Zellsystemen weiterentwickelt wurde, an. Die Resultate dieser Messung (Kapitel 3.1.2.4) zeigen eine Aufnahme von SWNT's durch NR8383-Zellen, die allerdings nur eine leichte Tendenz zur Dosisabhängigkeit zeigt. Dies könnte auf eine

besonders schnelle Aufnahme der SWNT's, die eine Sättigung verursachen könnten, zurückzuführen sein. Dabei könnten Faktoren wie die Verfügbarkeit von Oberflächenstrukturen (z.B. Zelloberflächenproteine, -rezeptoren, -gruppen), die zur Aufnahme benötigt werden, entscheidend sein. Ein wichtiges Ergebnis ist jedoch, dass auch die Aufnahme von biotechnologisch erzeugten SWNT's in NR8383 Makrophagen stattfindet. Die Aufnahme wird neben der Größe auch von anderen Faktoren, wie den Partikeloberflächeneigenschaften, beeinflussen. Dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen (Phagozytose, Pinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Diffusion) sein. Dabei spielen Wechselwirkungen zwischen dem Partikel und den verschiedenen Aufnahme regulierenden Instanzen, wie Rezeptoren, Membranlipiden der Zelloberfläche und/oder Proteine des umgebenden Mediums eine Rolle. Verschiedene oder unterschiedlich starke Interaktionen könnten somit die partikelspezifischen Aufnahmeraten erklären.

#### **4.3.4 Aktinabhängigkeit der Aufnahme von Partikeln mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Parametern.**

Aus der Untersuchung der Inhibition der Partikelaufnahme mit Cyt-D, resultiert eine Aktinabhängigkeit, als Hinweis auf einen klassischen Phagozytosemechanismus, sowohl bei der Aufnahme von DQ12 als auch von feinem wie ultra-feinem  $\text{TiO}_2$  und feinem CB. Damit konnte für die Aufnahme aller eingesetzten Partikel –mit Ausnahme von ultra-feinem CB– eine Abhängigkeit von der Aktinpolymerisation gezeigt werden. In allen Fällen konnte die durchflusszytometrisch gemessene Aufnahme jedoch nicht vollständig inhibiert, sondern nur auf ein Minimum von 5-25% (*Abb. 3.2.1.3/4*) reduziert werden. Dies ist auf die Wirkungsweise des Cyt-D zurückzuführen. Cyt-D inhibiert die Aktinpolymerisation und verhindert, die für den phagozytotischen Prozess nötige Aktin-Rekrutierung. Es kommt zu der Verklusterung (Traubenbildung) des Zellskeletts (siehe *Abb. 3.2.2.1 F* und *H*) was elektronenmikroskopisch untersucht und als typischer Effekt des Pilzgiftes beschrieben (Schliwa 1982) wurde. Durch die Verklusterung des Zellskeletts wird jedoch nur die Aufnahme von Partikeln, nicht aber ihre Anlagerung an der Zelloberfläche unterbunden (Parod und Brain 1986). Durchflußzytometrisch führt eine Anlagerung der Partikel, wie schon in Kapitel 3.2.1 beschrieben, zur gleichen Signalerhöhung wie eine Aufnahme (Stringer et al. 1996). Demnach sollte die verbleibende Erhöhung des Median SSC auf an der Zelloberfläche haftende Partikel zurückzuführen sein.

Alle 4 Partikeltypen (DQ12, feines und ultra-feines  $\text{TiO}_2$ , feines CB) würden demnach durch einen klassischen Phagozytosemechanismus aufgenommen, obwohl ihre Größe nicht unbedingt der für diesen Mechanismus postulierten Größe von  $>5\mu\text{m}$  entspricht. Konform zu den durchflußzytometrischen Ergebnissen der Aktininhibition konnte für die Aufnahme von DQ12 auch in der Immunohistochemie die Beteiligung des Aktins im phagozytotischen

Prozess anhand charakteristischer morphologischer Veränderungen des Zellskeletts gezeigt werden (*Abb. 3.2.2.1*). In den Fluoreszenzaufnahmen der Phalloidin gefärbten Zytospin-Preparationen lässt sich die Rekrutierung des F-Aktins anhand der Kondensation um und an den Partikelbindungsstellen, wie auch in die sich bildenden Pseudopodien verfolgen. Die zu beobachtenden morphologischen Umstrukturierungen des Zellskeletts in die sich bildenden Pseudopodien, die den Partikel umschließen, und die Bildung von Aktin-Foci durch welche das Phagosom aufgebaut wird, wurden als charakteristisch für den Aufnahmemechanismus über klassische Phagozytose beschrieben (Allen und Aderem 1996; Kwiatkowska und Sobota 1999). Diese F-Aktin Rekrutierung konnte bereits für Pullulanummantelte, superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel gezeigt werden. Die Zellskelettumstrukturierung hängt dabei vom Coating ab, da nach Belastung mit denselben, allerdings nicht ummantelten Partikeln, keine solche zu finden war (Gupta und Gupta 2004). Des weiteren konnte in der Aktin-Immunohistochemie der DQ12- wie auch der SWNT-Belastung (*Abb. 3.2.2.1/2*) eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, wie bereits von Brown et al. (2004) für F-Aktin gefärbte J774 Makrophagen nach einer Belastung mit PM<sub>10</sub> beschrieben wurde, gezeigt werden. Diese Beobachtungen bestätigt zum einen, einen DQ12 Aufnahmemechanismus über klassische Phagozytose und liefert zum anderen einen ersten Hinweis darauf, dass auch die SWNT-Aufnahme über eine klassische Phagozytose ablaufen könnte. Bevor sich aber über den Aufnahmemechanismus der SWNT's eine genauere Aussage machen lässt, sollten noch weitere gründliche Untersuchung, wie z.B. die Inhibition des F-Aktins durchgeführt werden.

Untersuchungen des Aufnahmemechanismus inhalierbarer Partikel durch Lungemakrophagen, -epithel- oder -endothelzellen werden schon seit Jahren durchgeführt. Der tatsächliche Aufnahmeweg vor allem der ultra-feinen Partikel wird jedoch noch immer diskutiert. Bereits 1996 wurde von Churg eine mögliche Beteiligung des Zellskeletts an der Partikelaufnahme durch Monolayer-Kulturen beschrieben. Dabei erfolgt die Aufnahme größerer Partikel vermutlich über einen Phagozytosemechanismus, während die Internalisierung kleinerer Partikel eher einem Endozytosemechanismus über Vesikel (coated pits) zuzuschreiben ist. Churg führt auch eine Abhängigkeit der Aufnahme von der ROS Generierung an, da das Abfangen gebildeter Radikale zu einer Herabsetzung der Partikelaufnahme führt. Dies entspricht im Ansatz den Beobachtungen, die sich aus der Kombination der Ergebnisse aus den Kapiteln 3.2.1 und 3.4.2 für Quarz ergeben. Die Inhibition des Aktin-Zellskeletts durch Cyt-D bewirkt eine nahezu vollständige Unterdrückung sowohl der durchflußzytometrisch gemessenen DQ12 Phagozytose, als auch der intrazellulär (*Abb. 3.4.2.1.4*) und extrazellulär (*Abb. 3.4.2.1.2*) gemessenen ROS Bildung. Die gute Korrelation, zwischen Aufnahme und ROS Generierung (*Abb. 3.4.2.1.5*), sowie die gezeigte Aufnahmereduktion durch den Radikalfänger DMSO (*Abb. 3.4.2.1.3*) stimmen mit

der Aussage Churgs überein. Jedoch ist auch ein Zusammenhang zwischen ROS Generierung und Aufnahme von Partikeln in umgekehrter Abhängigkeit beschrieben. So werden TiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer weniger reaktiven Oberfläche und somit geringeren Potential zur Radikalbildung in einem weitaus stärkeren Maß aufgenommen als kristalline Quarzpartikel. Des Weiteren konnte an AM gezeigt werden, dass frisch sonifizierte  $\alpha$ -Quarzpartikel, der reaktiveren Oberfläche zufolge, zwar einen weitaus höheren oxidativen Burst verursachen als gelagerte Partikel desselben Typs, beide jedoch in gleicher Menge aufgenommen werden (Kobzik 1995). Ähnliches war auch in dieser Studie zu beobachten. Die Aufnahme von feinem und ultra-feinem TiO<sub>2</sub> ist besonders hoch, obwohl beiden Partikeln eine geringe ROS-Generierungskapazität, z.B. im Vergleich zum Quarz, zugeordnet wird. Zudem wird nur die Aufnahme von feinem TiO<sub>2</sub> durch DMSO signifikant beeinflusst, wohingegen der Radikalskavenger keine Auswirkung auf die Phagozytose von ultra-feinem TiO<sub>2</sub> oder feinem CB hat (Abb. 3.2.1.4). Dies spricht eher gegen eine Abhängigkeit der Aufnahme von der ROS-Bildung. Weiterhin spricht gegen die von Churg (1995) vorgeschlagene Abhängigkeit der Aufnahme von der ROS-Bildung, dass nur nach einer DQ12 Belastung über 1h mit einer Dosis von 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine signifikante Herabsetzung der DQ12-Aufnahme durch DMSO erfolgt (Abb. 3.2.1.3). Ein DMSO-Einfluss auf die Aufnahme ist weder bei der Exposition gegenüber geringeren Dosen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Abb. 3.2.1.3, links), noch nach längeren Belastungszeiten (4h, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Abb. 3.2.1.3, links) zu verfolgen. Der Radikal fangende Effekt von DMSO auf die ROS-Messung dahingegen ist bei nahezu allen Belastungszeiten und -konzentrationen zu beobachten. Wäre die herabgesetzte ROS-Konzentration der entscheidende, die Aufnahme reduzierende Effekt, sollte dieses bei allen Belastungen zu verfolgen sein. Demnach sollten andere DMSO-Effekte, als ausschließlich die bewirkte Reduktion der radikalen Spezies ausschlaggebend für die Aufnahme sein.

Ein solcher Effekt könnte eine DMSO-induzierte Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie z.B. des hydrophilen/hydrophoben Charakters der Partikeloberfläche, oder eine Veränderung der Zellmembranstruktur, wie z.B. der Membranfluidität sein. Auf das Lösungsmittel zurückzuführende Modifikationen der Partikel oder der Zelloberfläche könnten die Stärke der Wechselwirkung zwischen Partikel und Zelle und somit die Aufnahmekapazität herabsetzen.

Die Herabsetzung der DQ12 Aufnahme (Abb. 3.2.1.3) könnte also durch eine DMSO verursachte Partikeloberflächen- oder Zellmembranmodifikation hervorgerufen sein. Diese würde zur Senkung der Wechselwirkungsintensität zwischen Partikel und Zelle und der Aufnahmerate führen. Durch Interaktionen mit Komponenten des umgebenden Mediums könnten diese Veränderungen nach 4h wieder aufgehoben sein, sodass das Lösungsmittel keinen Effekt mehr auf die Phagozytose hat.

Demnach erscheint die Partikelaufnahme als von der ROS-Generierung oder der Anwesenheit reaktiver Sauerestoffspezies unabhängig. Die Ergebnisse dieser Studie legen eher eine Abhängigkeit der ROS Bildung von der Aktinkomponente des Zellskeletts bei der Formierung des NADPH-Oxidase-Komplexes nahe. Daraus ergibt sich ein von der Signaltransduktionskaskade abhängiger Zusammenhang zwischen ROS-Bildung und Partikelaufnahme, auf den später eingegangen werden soll.

Die signifikante Inhibition der Aufnahme nahezu aller Partikeltypen durch Cyt-D, aus der sich ein von der Größe unabhängiger Internalisierungsmechanismus über die Aktin vermittelte Phagozytose ergibt, steht ebenfalls nicht im Einklang mit Churgs Aussagen, der für den Aufnahmemechanismus kleinerer Partikel eher einen endozytotischen Mechanismus postuliert. Dem Ergebnis aus Kapitel 3.2.1.4 stehen allerdings auch einige Untersuchungen der Aufnahme von Partikeln verschiedener Größe in Makrophagen entgegen. In AM wird *in vitro* die Aufnahme feiner Latexbeads (1-0,2 $\mu$ m) mit Cyt-D inhibiert, während der Inhibitor der Aktinpolymerisation keinen Effekt auf die Aufnahme von ultra-feinen Latex-Beads (< 0,2 $\mu$ m) zeigt. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Aufnahme der ultra-feinen Modellpartikel nicht über einen klassischen Phagozytose Mechanismus abläuft (Geiser et al. 2005). Die größeren Latex-Beads dagegen werden, wie auch inhalierbare Mikrosphären (2-3 $\mu$ m, Jones et al. 2002), phagozytiert. Auch Oberdörster et al. 2005 und Nel et al. 2006 beschreiben, zusammenfassend für die Aufnahme von ultra-feinen Partikel durch nicht-phagozytotische Zellen, einen Caveolin oder Clathrin abhängigen, endozytotischen Mechanismus. Beide zeigen jedoch auch auf, dass neben der Partikelgröße die Partikeloberflächeneigenschaften und mögliche Modifikationen durch Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium (z.B. mit Proteinen des Lungen-Surfactants) die Aufnahme beeinflussen können.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1 sprechen für einen Aufnahmemechanismus aller Partikelgrößenfraktionen über klassische Phagozytose. Dies könnte durch eine stärkere Abhängigkeit der Aufnahme von den Oberflächeneigenschaften als von Größe der Partikel erklärt werden. Die Aufnahme könnte durch Wechselwirkung der Partikel mit Substanzen des umgebenden Mediums beeinflusst sein. Ein solches Coating könnte zum einen Vergrößerungs- oder zum anderen Markierungseffekte (Opsonierung) bewirken, die auch die ultra-feinen Partikel den Rezeptoren der klassischen Phagozytose zugänglich machen würden. Eine unterschiedliche Affinität der Partikel zu diesen Substanzen führt zu einer verschieden schnellen oder starken Ummantelung durch diese. Dies würde sich auf die Stärke der Aufnahme, wie auch auf die Aufnahmegeschwindigkeit auswirken, die auch in den Ergebnissen aus Kapitel 3.1 wieder zu finden sind. Mögliche ummantelnde Substanzen, welche die Partikel für eine mögliche Phagozytose markieren und somit die Aufnahme erleichtern oder erschweren würden, könnten z.B. Immunglobuline, Komplement (Opsonierung) oder Zucker und Lipide sein. Eine Wechselwirkung mit solchen Substanzen

ist für viele Partikel untersucht worden. So konnte eine Absorption von HDL wie auch LDL auf verschiedene fibrogene und inerte Partikel gezeigt werden, wobei fibrogene Mineralstäube (wie DQ12, Kaolin und Talk) eine höhere Affinität zu HDL zeigen (Bogatu und Contage 2005). Eine andere Studie mit TiO<sub>2</sub> konnte zeigen, dass die Opsonierung der Partikel mit Surfactant-Protein-A (SP-A) zur Erhöhung der Phagozytoserate führt (Stringer und Kobzik 1996).

Des Weiteren ist auch die Aggregation ultra-feiner Partikel nicht auszuschließen. Dadurch könnte die Partikelgröße so moduliert werden, dass eine Aufnahme über die klassische Phagozytose wahrscheinlich ist.

Mit Ausnahme von ultra-feinem CB, über dessen Aufnahme sich aus den durchflusszytometrischen Messungen keine Aussagen machen ließ, konnte gezeigt werden, dass alle Partikel unabhängig von der Größe über die klassische Phagozytose aufgenommen werden. Die unterschiedliche Aufnahmekapazität der verschiedenen Partikel könnte auf eine Aufnahme über unterschiedliche Phagozytose-Rezeptoren, eine unterschiedlich starke Wechselwirkung mit diesen oder von unterschiedlichen Ummantelungen durch Komponenten des umgebenden Mediums hervorgerufen werden. Die eindeutige Klärung des Aufnahmemechanismus bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, wie sie exemplarisch für DQ12 durchgeführt wurde und im Folgenden diskutiert werden soll. Für eine phagozytotische Aufnahme der SWNT's spricht die Phaloidinfärbung als erstes Indiz, wobei zukünftige Untersuchungen jedoch erst Klarheit darüber liefern können.

#### 4.4 Phagozytotischer Mechanismus der DQ12-Aufnahme.

Neben der Größe der DQ12-Partikel von  $0,96\mu\text{m}$  ( $>0,5\mu\text{m}$ ) deutet auch die zeitaufgelöste Mikroskopie (*Abb. 3.2.1*), in der ein sehr aktiver Aufnahmeprozess gezeigt werden konnte, auf einen DQ12-Aufnahme Mechanismus über klassische Phagozytose hin. Zusätzlich konnte die Beteiligung des Aktinzellskeletts an der DQ12-Aufnahme durchflusszytometrisch, wie auch immunohistochemisch, nachgewiesen werden.

Nun sollte der die Phagozytose vermittelnde Rezeptor am Beispiel von DQ12 spezifiziert werden. Die klassische Phagozytose kann, wie in Kapitel 1.3.3 eingehend beschrieben, über ein breites Spektrum von Rezeptoren vermittelt werden. Eine erste Eingrenzung der beteiligten Rezeptoren erfolgte anhand der durchflusszytometrischen Messung der Aufnahme unter Inhibition verschiedener Rezeptoren. Zur Rezeptorblockierung wurden spezifische Antikörper (Fc $\gamma$ R und CR) oder, falls diese nicht kommerziell zur Verfügung standen, je zwei Agonisten (ScR, Poly-I und Fucoïdan; MR, m- $\alpha$ -D-MP und Mannan), um ungewollte Nebeneffekte auszuschließen, eingesetzt. Aus dieser Untersuchung ergab sich ein Inhibitionsmuster, bei dem die Inhibition des Fc $\gamma$ R eine herausragende Reduktion der Phagozytose zeigte. Eine Beteiligung des ScR ist an der DQ12 Phagozytose auszuschließen, da durch die Inhibition desselben keine Verminderung der Partikelaufnahme bewirkt wurde. Gegenteilig erhöhte sich sogar die Aufnahme bei der Inkubation mit Poly-I nach der Belastung mit der hohen Quarzdosis. Dieser Effekt ist auch in der kombinatorischen Inhibition zu verfolgen. Bei der Zugabe von Poly-I in den Inhibitorcocktail, erhöhte sich, die durch den Einsatz der Kombination der 3 Inhibitoren erzielte Phagozytosereduktion leicht. Dies ist vermutlich auf unspezifische Nebeneffekte des Inhibitors zurückzuführen, da Fucoïdan keine signifikante Steigerung der Phagozytosekapazität zeigt. Ein Effekt, der zur höheren Phagozytosekapazität der Makrophagen nach der Vorinkubation mit Poly-I führt, könnte z.B. ihre Aktivierung sein. Der Einsatz des CR-Antikörper und der MR-Agonisten dagegen reduzierten die Phagozytose, jedoch in einem weitaus geringeren Ausmaß, als die Inhibition des Fc $\gamma$ R. Sie könnten somit auch einen Beitrag zur DQ12 Aufnahme leisten, allerdings scheint der Fc $\gamma$ R der entscheidende Rezeptor zu sein. Das zeigt sich vor allem darin, dass durch Inhibition des Fc $\gamma$ R eine gleichwertige Reduktion der Phagozytose wie mit Cyt-D und der kombinatorischen Inhibition erzielt wird, welche einer maximal erreichbaren Inhibition zu entsprechen scheint. Die verbliebene minimale Erhöhung des SSC könnte durch nicht aufgenommene Partikel, die mit der Zelloberfläche in Wechselwirkung treten, hervorgerufen sein. Eine Wechselwirkung mit Rezeptoren ist bereits für die Aktininhibition beschrieben (Stringer et al. 1996), doch könnten auch nach Inhibition der Rezeptoren noch Wechselwirkungen mit den Nicht-Rezeptor-Komponenten der Membran, z.B. mit den Lipiden oder Proteinen, auftreten.

---

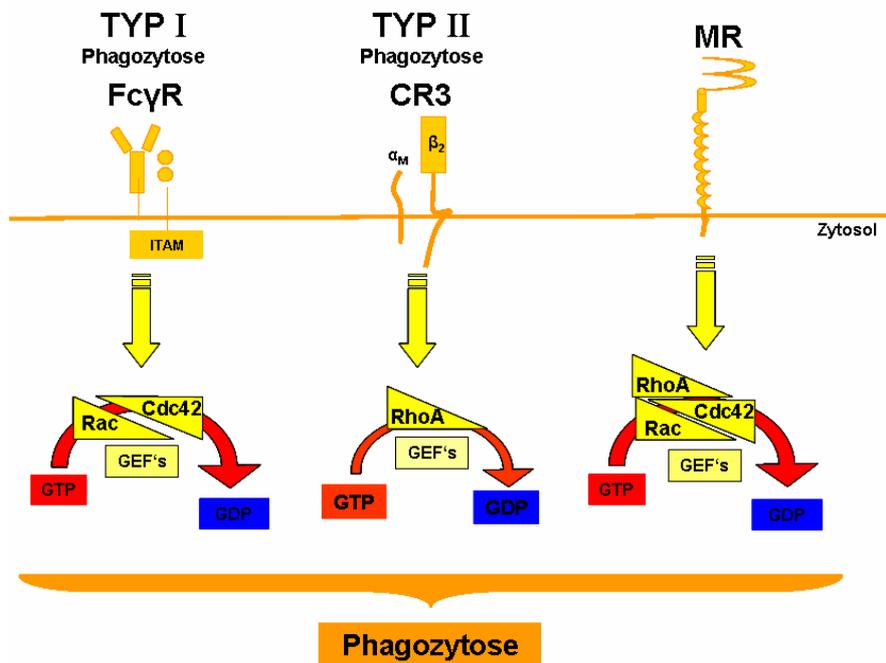
Die Inhibition der Phagozytose durch Suramin ist ebenfalls ein möglicher Hinweis auf eine FcR-vermittelte Phagozytose, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition des ATP-Rezeptors die Aufnahme IgG-opsonierter Hefenpartikel herabsetzt. Dabei wird vermutlich die Phagozytose, wie auch die Generierung von ROS durch den FcR in neutrophilen Granulozyten über einen ATP-vermittelten Mechanismus unter der Beteiligung des P2X über Platelets reguliert (Zalavary et al. 1996). Die purinergen Rezeptoren (P2Y und P2X), deren Expression auch in NR8383 gezeigt werden konnte, regulieren ATP-abhängig die intrazelluläre Kalziumkonzentration über die Phospholipase-C (Bowler et al. 2003). Kalzium wiederum scheint eine Rolle in der Phagozytose zu spielen, doch wird kontrovers über die Notwendigkeit dieses Second-Messengers diskutiert. So wird die FcR-vermittelte Phagozytose in humanen Neutrophilen sowohl als  $Ca^{2+}$  abhängig, wie auch als unabhängig bezeichnet (Della Bianca et al. 1990, Kobayashi et al. 1995). Neuere Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung der Syk-Kinase während der Fc $\gamma$ R-vermittelten Phagozytose in Makrophagen  $Ca^{2+}$ -abhängig ist, wohingegen in dendritischen Zellen die Aktivierung der Kinase  $Ca^{2+}$ -unabhängig abläuft (Canetti et al. 2003, 2006). Ebenso wurde für die während der Fc $\gamma$ R-vermittelten Phagozytose stattfindende focale Exozytose (die Fusion einer neuen Membran mit den sich bildenden Pseudopodien, um ihre Verfügbarkeit während der Extension zu gewährleisten) eine  $Ca^{2+}$ -unabhängigkeit festgestellt (Di et al. 2003). Andererseits kommt es während der FcR-vermittelten Phagozytose zu einer  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung ins Zytoplasma (Lundqvist-Gustavsson et al. 2000), was auf eine  $Ca^{2+}$ -Funktion während dieses Prozesses hinweist. Allerdings konnte eine  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung auch während der Phagozytose durch andere Rezeptoren wie MR und CR beobachtet werden (Kwiatkowaska und Sobota 1999), sodass die Beteiligung von  $Ca^{2+}$  nicht als FcR-spezifisch angesehen werden kann.

Die tragende Rolle des Fc $\gamma$ R in der DQ12-Phagozytose konnte des Weiteren in der immunohistochemischen Untersuchung der Rezeptorrekrutierung bestätigt werden. Während in der mikroskopischen Untersuchung der DQ12 Phagozytose keine Umstrukturierungen von CR und MR zu beobachten sind, zeigt die Anordnung des Fc $\gamma$ R phagozytosecharakteristische Veränderungen. Eine ringförmige Klusterung des Rezeptors um das sich bildende Phagosom ist zu beobachten (*Abb. 3.3.2.1*).

Aus den Ergebnissen der inhibitorischen, durchflusszytometrischen wie auch der immunohistochemischen Untersuchungen der Phagozytose konnte die dominante Rolle des Fc $\gamma$ R im phagozytotischen Prozess von DQ12-Partikeln demonstriert werden.

Der Fc $\gamma$ R scheint also verantwortlich für die Aufnahme von DQ12-Partikeln durch NR8383-Makrophagen zu sein. Um dieses Ergebnis abzusichern und um die Quarz induzierte Signalkette, die letztlich zu der beschriebenen Entzündungsreaktion führen sollte, zu charakterisieren, wurde dieselbe sowohl durch proteinbiochemisch als auch durch den

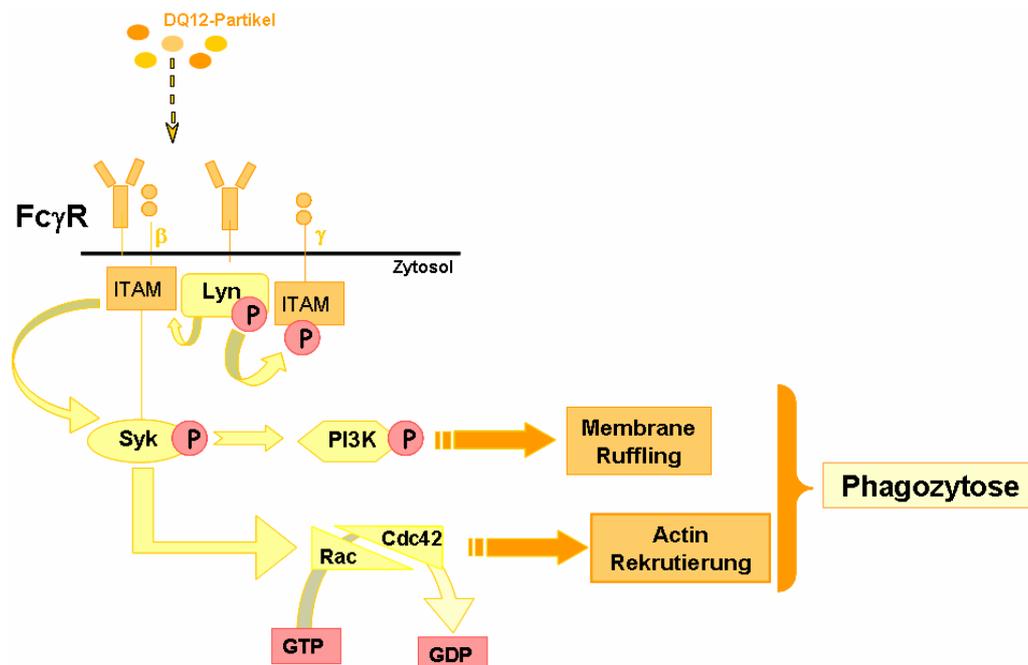
Einsatz von Inhibitoren eingehend untersucht. Zunächst konnte durch einen Pulldown-Assay die Aktivierung der GTPasen Rac und Cdc42 gezeigt werden, wohingegen der Aktivierungsstatus von Rho von der Quarzbelastung unbeeinflusst blieb (Abb. 3.3.3.1.1). Die Aktivierung von Rac und Cdc42 ist typisch für eine Phagozytose über den FcγR, die auch als TypI-Phagozytose bezeichnet wird. Die durch den CR vermittelte Aufnahme von Partikeln dagegen erfolgt nur unter Beteiligung von Rho, in einem als Typ-II-Phagozytose bezeichneten Internalisierungsprozess. Der MR vermittelte Aufnahmemechanismus bedarf sogar der Aktivierung aller drei GTPasen (Abb. 4.4.2, Allen und Aderem 1996, Cox et al 1997, Massol et al. 1998, Caron und Hall 1998, Lee et al. 2000, Olazabal et al. 2002, Zhang et al. 2005). Somit bestätigt das gezeigte Aktivierungsmuster den FcγR als den die DQ12-Phagozytose mediiierende Rezeptor und sowohl der CR als auch der MR können als hauptsächlicher Mediator der DQ12 Phagozytose ausgeschlossen werden.



**Abb. 4.4.2:** Beteiligung der GTPasen Rac, Cdc42 und Rho an der für den FcγR typischen TypI-Phagozytose, der für den CR beschriebenen TypII Phagozytose und der Phagozytose über den MR (verändert nach Allen und Aderem 1996, Cox et al 1997, Caron und Hall 1998, Massol et al. 1998, Lee et al. 2000, Olazabal et al. 2002, Zhang et al. 2005).

Weitere Bestätigungen für eine Typ-I-Phagozytose konnten über den inhibitorischen Ansatz und die Rac1 Immunohistochemie gefunden werden. Sowohl die Inhibition aller GTPasen durch Lovastatin, wie auch die spezifische Rac1 Inhibition mit NSC23766 bewirkten eine signifikante Reduktionen der DQ12-Phagozytoserate (Abb. 3.3.4.4 und 3.3.4.6). Die von Hoppe und Swanson (2004) mit Hilfe von zeitaufgelöster Mikroskopie untersuchte Rekrutierung von Rac1 zu den sich bildenden Phagosomen, ist in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Rac1-Immunohistochemie (Abb. 3.3.5.1) zu verfolgen.

Nachfolgend wurde auf ähnliche Weise wie bei den GTPasen die Beteiligung verschiedener Kinasen an der DQ12-Phagozytose gezeigt. In Western Blot Analysen, wie auch durch die Inhibition der Nicht-Rezeptortyrosine-Kinasen mit Genistein wurde die Induktion der für den FcγR beschriebenen Signaltransduktionskaskade DQ12-induziert nachvollzogen. Somit wurde die Hypothese der DQ12-Aufnahme über den FcγR bekräftigt. Die für die FcγR-vermittelte Phagozytose notwendige Phosphorylierung von Tyrosin-Kinasen, die durch Genistein inhibiert wird (Greenberg et al. 1993), wurde im durchflusszytometrischen Ansatz für die DQ12-Phagozytose gezeigt (Abb. 3.3.4.1). Des Weiteren wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern die Aktivierung der Src-Kinase Lyn, sowie der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Syk und PI3-K demonstriert (Abb. 3.3.3.2.1, 2 und 6). Anhand der Untersuchungsergebnisse lässt sich die DQ12-induzierte Signaltransduktionskette in NR8383 Zellen wie folgt beschreiben (siehe auch Abb. 4.4.2):



**Abb. 4.4.2:** DQ12 induzierte Signaltransduktionskette in NR8383-Zellen die für die FcγR-Phagozytose. nach dem in der Literatur beschriebene (Greenberg S. 1999, Kwiatkowska et al 1999, Gu et al 2003).

Nach der Ligandenbindung, in diesem Fall DQ12, kommt es zur Rezeptoraggregation an der Partikelbindungsstelle, wie in der FcγR-Immunohistochemie (Abb. 3.3.2.1) zu verfolgen war. Danach wird unter anderem die Src-Kinase Lyn durch die Dephosphorylierung des Tyrosins an Position 509 aktiviert (Abb. 3.3.3.2.1). Durch die Aktivierung der Src-Kinase Lyn sollte dann durch Interaktion mit dem Rezeptor, unterstützt von Lipiddrafts, die Phosphorylierung der ITAM-Domäne des FcγR katalysiert werden. Wie in der Literatur beschrieben folgt über die Aktivierung verschiedener Src-Kinasen die Rekrutierung und Phosphorylierung der zytosolständigen Kinase Syk, was wiederum Quarzinduziert im Western-Blot gezeigt werden konnte (Abb. 3.3.3.2.4). Diese wiederum leitet weitere Signale für die Aufnahme des gebundenen Partikels ein (Kiefer et al.1998, Fitzer-Attas et al. 2000, Kwiatkowska und

Sobota 2001). Die während der Aufnahme von DQ12-Partikeln durch die Phosphorylierung des Tyrosins in Position 525/26 aktivierte (*Abb. 3.3.3.2.4*) Tyrosin-Kinase Syk ist während der Fc $\gamma$ R vermittelten Phagozytose essentiell für die Aktinrekrutierung (Cox et al. 1996). Auch eine Phosphorylierung von Zap-70(Tyr319)/Syk(Tyr352) ist zu beobachten (*Abb. 3.3.3.2.5*). Allerdings tritt diese, im Gegensatz zur Aktivierung anderer Kinasen und GTPasen, erst nach 60min auf. Die Phosphorylierung von Zap-70(Tyr 319)/Syk(Tyr352) sollte somit weder für die Partikelbindung noch für die Partikelinternalisation, die bereits innerhalb der ersten 15min initialisiert wird, nötig zu sein. Ähnliches wurde bereits in Zap-70 transfizierten, monozytischen Zelllinien (U937 und THP-1) beobachtet, in denen während der Fc $\gamma$ R-Aggregation nur Syk, nicht aber Zap-70 aktiviert wird (Taylor et al. 1997). In COS1-Zellen erhöht sich die Fc $\gamma$ R-Phagozytosekapazität nach Transfektion mit Syk, wohingegen eine Zap-70-Transfektion keinen Einfluss auf die Aufnahme von IgG sensitiven roten Blutzellen zeigt (Hunter et al. 1999). Demnach spielt nur Syk eine entscheidende Rolle in der Fc $\gamma$ R-vermittelten Phagozytose. Zap-70 dagegen sollte nicht am Aufnahmeprozess beteiligt sein. Obwohl Syk und Zap-70 derselben Familie von Nichtrezeptor-Tyrosin-Kinasen angehören, eine starke genetische Homologie aufweisen und über ihre SH2-Domäne an das doppelt phosphorylierte ITAM-Motiv des FcR binden können, scheinen beide eine sehr unterschiedliche Funktion zu haben (Yagi et al.1994, Strzelecka et al. 1997), wobei die Aufgabe von Zap-70 in der Signaltransduktion des Fc $\gamma$ R noch nicht aufgeklärt werden konnte.

Neben Syk ist auch die Kinase PI3K, deren Aktivierung nach der 10min DQ12 Belastung gezeigt werden konnte (*Abb. 3.3.3.2.6*), von essentieller Bedeutung in der Fc $\gamma$ R-vermittelten Phagozytose. PI3K reguliert in der Fc $\gamma$ R-vermittelten Phagozytose die Membranzumstrukturierung (Membran Ruffling), ist jedoch nicht an der Aktinanzumstrukturierung, die zur Ausbildung von Pseudopodien führt, beteiligt. So wird die Phagozytose IgG opsonierter Schafserthrozyten durch RAW Zellen mit Wortmanin oder LY294002, zwei spezifischen PI3K Inhibitoren, zwar inhibiert, allerdings ohne die Aktinanzumstrukturierung zu beeinflussen (Cox et al. 1999). Allerdings ist eine PI3K vermittelte Umstrukturierung des corticalen Aktins während der Phagozytose über den Fc $\gamma$ R beschrieben. Dabei katalysiert die aktivierte Syk-Kinase die Phosphorylierung der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3K, worauf die katalytische p110-Untereinheit der Kinase die Phosphorylierung von Phosphoinositiden wie PIP<sub>3</sub> katalysiert. PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> wiederum sorgt für die Umstrukturierung des corticalen Aktins, welches für die Membranzumstrukturierung (Membran Ruffling) nötig ist (Strzelecka et al.1997, Gillooly et al. 2001). Während der Fc $\gamma$ R vermittelte Phagozytose ist PI3K essentiell für die Membranrekrutierung und die maximale Pseudopodienausbildung, sowie den Schluss der Membran hinter dem aufzunehmenden Partikel (Greenberg 1999, Fruman und Cantley 2002).

Die DQ12-induzierte Aktivierung der FcγR Phagozytosesignalkaskade scheint allerdings zeitabhängig zu sein. So zeigt der Aktivierungszustand der Src-Kinase Lyn bereits 5min nach Partikelzugabe einen maximalen Anstieg. Danach sinkt die Aktivität mit der Zeit ab und ist nach 60min nur noch minimal. Ein vergleichbares zeitabhängiges Aktivierungsmuster ist auch bei den anderen Kinasen (Syk525/526 und PI3K, maximale Aktivierung nach 10min), sowie bei den GTPasen (Rac1 und Cdc42), die nach 15min DQ12-Belastung aktiviert sind und deren Aktivitätsstatus nach 60min stark abgeschwächt ist, zu finden. Die beobachtete Zeitabhängigkeit der Aktivierung der Kinasen Lyn und Syk, sowie der GTPasen Rac und Cdc42 könnte dem zeitlichen Ablauf der Phagozytose entsprechen. Während der schnell erfolgenden Partikelbindung, die unmittelbar nach Zugabe der Partikel stattfindet (5-15min Belastung), kommt es zur Rezeptor-Clusterung und zur Aktivierung der Lyn-Kinase, die schon nach 5min maximal ausgeprägt ist. Danach sinkt der Aktivierungsstatus dieser Kinase während des Internalisierungsprozesses (10 bis 15min) und PI3K und Syk werden gefolgt von den GTPasen aktiviert (10-15min), welche das Membran Ruffeling und die Aktin-Umstrukturierung vermitteln. Eine ähnliche zeitabhängige Aktivierung zeigt sich auch bei der Aufnahme von TiO<sub>2</sub>-Partikeln oder IgG ummantelten Latexbeads in der Makrophagenzelllinie J774A.1. Nach Belastung dieser murinen Makrophagen mit TiO<sub>2</sub> erfolgt die Aktivierung der Src-Kinase Lyn, sowie der PKC, deren Inhibition zur Inhibition der Partikelphagozytose führt, zu einem gleichartigen Aktivierungsmuster mit einem Maximum bei 2min, welche innerhalb von 45min wieder auf das Grundniveau sinkt (Palmbos et al. 2002). Die Belastung mit IgG opsonierten Latexbeads über 10min bei 4°C, die nur die Bindung der Partikel erlaubt, führt zur Aktivierung von Lyn, während Syk nicht stimuliert wird. Nach einer Temperaturerhöhung auf 37°C, bei der auch die Internalisierung stattfinden kann, sinkt der Aktivierungszustand der Src-Kinase Lyn innerhalb von 10min, wohingegen eine Aktivierung von Syk zu verfolgen ist (Strzelecka et al. 2002). DQ12 induziert also ein zeitabhängiges Aktivierungsmuster. Da in einem Zeitraum von 1h bis 24h weitere Partikel aufgenommen werden (*Abb. 3.1.2.1.2*) kann nicht von einem Abbruch der Phagozytose, infolge einer Partikelabsättigung der Zellen ausgegangen werden. Da Zellen und Partikel im ständigen Kontakt stehen sollte die Phagozytose kontinuierlich erfolgen. Infolge einer konstant stattfindenden DQ12-Phagozytose sollte also auch innerhalb von 60min noch eine Signalinduktion hervorrufen werden. Ein zeitliches Aktivierungsmuster dürfte nicht auftreten. Jedoch scheint eine limitierende Größe die kontinuierliche Partikelaufnahme zu verhindern, sodass eine zyklische Aktivierung der Phagozytosesignalkette zu verfolgen ist. Dies könnte durch die Verfügbarkeit des Rezeptors hervorgerufen sein. Dieser wird während der Phagozytose mit dem Phagosom internalisiert und über einen Recyclingprozess wieder an die Zelloberfläche abgegeben. Während dieses Prozesses ist er nicht mehr für die Phagozytose verfügbar, was zu einer verminderten Oberflächenexpression und zur zeitlichen Limitierung der

Phagozytose führen könnte. Ein anderer Effekt, der diese zeitliche Herabsetzung der Phagozytosesignalstärke erklären könnte, wäre die inhibitorische Wirkung der ITIM-Domäne des FcγRIIB. ITIM, das Immunrezeptor-Tyrosinebased-Inhibitory Motiv, reguliert durch Wechselwirkung mit der aktivierenden Rezeptorendomäne ITAM deren Aktivität. Durch diese negative Regulierung wird z.B. in Makrophagen die Aufnahme von IgG-Komplexen herabgesetzt (Sautès-Fridman et al. 2003). Eine solche Inhibition könnte sich aus der detektierten Phosphorylierung des Tyrosin an Position 292 der ITIM-Domäne des FcγRIIB ergeben, die nach 60min auftritt und somit genau zu dem zeitlichen Ablauf der FcγR-Signalkaskade passt (*Abb. 3.3.3.2.7*).

Zusammenfassend lässt sich an der Untersuchung der DQ12 induzierten Signaltransduktionskette während der Partikelaufnahme, die für den FcγR beschriebene Signaltransduktionskaskade verfolgen. DQ12 löst dabei in den ersten 15min die Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Kinasen Lyn, Syk, PI3K und der GTPasen Rac1 und Cdc42 aus. Dieses phagozytotische Signal könnte über die ITIM-Domäne negativ reguliert werden oder von der Verfügbarkeit des Rezeptors an der Zelloberfläche beeinflusst sein.

#### **4.5 Pro-inflammatorische Antwort auf die DQ12-Exposition. Untersuchung der DQ12 induzierten ROS-Generierung und TNF- $\alpha$ -Freisetzung.**

In Kapitel 3.4 konnte in NR8383 Zellen gezeigt werden, dass die Quarz-Exposition der Makrophagen zu einer dosisabhängigen ROS-Bildung (gesamt, *Abb. 3.4.1.1.3*; intrazellulär, *Abb. 3.4.1.1.2*; extrazellulär, *Abb. 3.4.1.1.1*) und TNF- $\alpha$ -Freisetzung (*Abb. 3.4.1.3.1*) unter der Aktivierung des NF- $\kappa$ B (*Abb. 3.4.1.2.1*, *Abb. 3.4.1.2.2*) führt. Dies ist bereits vielfach für Quarz und andere Partikel gezeigt worden. So haben Imrich et al. (1999) bereits eine umfassende Untersuchung sowohl der ROS-Generierung als auch der TNF- $\alpha$ - und MIP2-Freisetzung in Hamster AM mit unterschiedlichsten Partikeln, unter anderem auch mit Quarz, durchgeführt und mit dem Stimulus durch LPS oder PMA verglichen (Imrich et al. 1999). Auch *in vivo* gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen, die auf die Bildung von ROS und/oder die Freisetzung von Zytokinen in Relation zu einer Lungenschädigung nach Quarz-Inhalation oder -Instillierung eingehen (Albrecht et al. 2004, Porter 2004, Albrecht et al. 2005, Porter et al. 2006). Eine besonders umfangreiche Studie der Quarz induzierten Bildung und Freisetzung von verschiedensten inflammatorischen Mediatoren (wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren) von Rao et al. (2004), konnte die Freisetzung und Bildung von IL-6, MIP-2, MCP-I und TNF- $\alpha$  in AM zeigen. Auch der Zusammenhang zwischen der quarzdosisabhängigen Bildung von ROS, NF- $\kappa$ B-Aktivierung und TNF- $\alpha$ -Freisetzung wurde bereits in einem mechanistischen Schema zusammengefasst und referiert (Castranova 2004). Erstmals wurde jedoch in der gegenwärtigen Untersuchung die Abhängigkeit der ROS-Bildung sowie der TNF- $\alpha$ -Freisetzung von einem intakten Aktinzellskelett und/oder der Partikelaufnahme (Kapitel 3.4.2) gezeigt. So konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie, die eine Mehrparameterstudie ermöglichte, eine Korrelation (*Abb. 3.4.2.1.5*) zwischen der DQ12 Phagozytose und der ROS-Generierung dargestellt werden. Der Zusammenhang zwischen Aufnahme und ROS-Bildung wurde auch in AM und Monozyten gezeigt. So steigt die durchflusszytometrisch über die Oxidation von DHR and HE (Hydroethidine) gemessene intrazelluläre ROS-Konzentration mit der Menge aufgenommener Quarz-, ROFA- oder TiO<sub>2</sub>-Partikel (Imrich et al. 1999). Auch die, durch die Exposition der Monozyten gegenüber Zirkonia- oder Aluminium-Partikeln, reduzierte Latex-Bead-Phagozytose geht mit der Verminderung des oxidativen Bursts einher (Nkamgueu et al. 1999). Allerdings wurden in allen diesen Studien keine inhibitorischen Untersuchungen, wie hier mit Cyt-D, durchgeführt, die einen direkten Zusammenhang zwischen der ROS-Generierung und der Aktinkomponente des Zellskeletts darstellten.

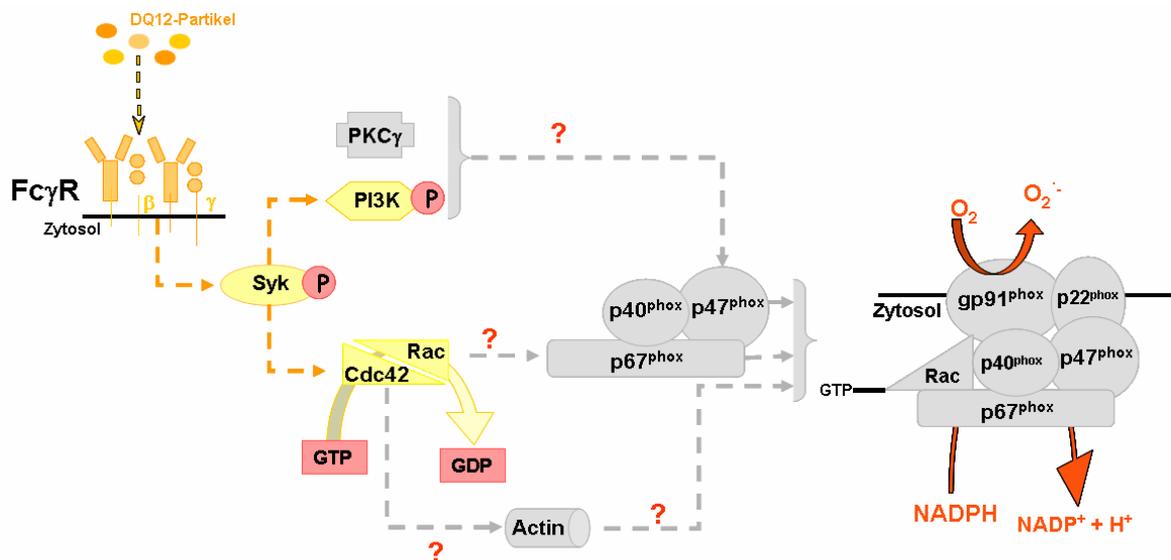
In Kapitel 4.3.4 wurde bereits die mögliche Modulation der Aufnahmekapazität durch die ROS-Generierung diskutiert. Es wurde darauf eingegangen, dass die gute Korrelation zwischen Aufnahme und ROS-Generierung, sowie die synchrone Reduktion von Partikelaufnahme und ROS-Bildung durch Cyt-D und DMSO, die Aussage einer von der

Radikalbildung abhängigen Aufnahme zwar unterstützt (Churg 1996), diese jedoch nicht hinreichend sein könne. Dies wurde durch die Beobachtungen von Kobzik (1995), dass Partikel mit geringerem Radikalbildungspotential ( $\text{TiO}_2$ /kristalline Quarzpartikel, frisch sonifizierte/gelagerte Quarzpartikel) in weitaus stärkerem Maß aufgenommen werden, unterstützt.

Im Folgenden soll nun die Abhängigkeit der ROS Bildung von einem intakten Aktinzellskelett, die ebenfalls mit der Korrelation in Einklang steht, diskutiert werden. Dabei wird besonders auf eine mögliche Funktion des Aktins bei der Formierung des NADPH-Oxidase-Komplexes, die für die ROS-Bildung verantwortlich sein könnte (Kapitel 1.3.3.1, *Abb. 1.3.3.1.4*) eingegangen. Eine Abhängigkeit zwischen der Freisetzung, wie auch der intrazellularen ROS-Bildung von einem funktionsfähigen Aktinzellskelett wurde bereits in Neutrophilen gezeigt. Die durch die Phagozytose von Komplement opsonierten Hefepartikeln induzierte ROS-Freisetzung konnte durch die Inhibition des Aktinzellskeletts mit Cyt-B stark reduziert werden (Granfeldt 2001). Auch in humanen Neutrophilen konnte dem Aktinzellskelett eine mögliche Rolle in der Bildung von ROS zugeordnet werden (Serrander et al. 1999).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der beobachteten DQ12-induzierten intra- wie auch extrazellularen ROS-Bildung, welche ebenfalls durch Cyt-D völlig inhibiert wurde. Die Hypothese einer Beteiligung des Zellskeletts an der ROS-Generierung wird auch durch die Messung der Fc $\gamma$ R-induzierten ROS-Bildung unterstützt. Sowohl intra- wie auch extrazellulär wurde nach Inkubation der NR8383-Zellen mit dem spezifischen Fc $\gamma$ R-Antikörper eine ROS-Freisetzung nachgewiesen, die mit der Quarz induzierten vergleichbar war (*Abb. 4.1.1.1.2*). Die Literatur beschreibt einen molekularen Mechanismus der ROS-Generierung, bei dem Aktin aktiv an der Bildung beteiligt sein könnte. Kurz zusammengefasst wird über verschiedene Rezeptoren (CR3, Fc $\gamma$ IIIR, Fc $\gamma$ IIIIR) unter Phosphorylierung mehrerer Tyrosin-Kinasen der NADPH-Oxidase-Komplex aktiviert, der die ROS-Bildung katalysiert. Aktin könnte im Komplexierungs- und Aktivierungsprozess des NADPH-Oxidase-Komplexes beteiligt sein (Babior 1999, Forman und Torres 2002, Park 2003, Sumimoto et al. 2004). Dabei erfüllen die GTPasen Rac1 und Cdc42 wichtige Aufgaben. So konnte eine duale Funktion von Rac1 bei der Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes gezeigt werden. Die GTPase ist an der Anbindung von p67<sup>phox</sup> an die Membran, wie auch an der Induktion einer aktivierenden p67<sup>phox</sup> Konformationsänderung beteiligt (Patil et al. 2004, Sarfstein et al. 2004). Cdc42 ist in eine Aktin-Filament-Umstrukturierung involviert, die zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führt (Qian et al. 2005). Weiterhin konnte eine Beteiligung von Syk, PKC $\delta$  und PI3K gezeigt werden, wobei PKC $\delta$  wie auch PI3K an der Phosphorylierung und Translokation der p47<sup>phox</sup> beteiligt sind (Yamamori et al. 2004, Bey et al. 2004, Underhill et al. 2005). Für die Quarz-induzierte ROS Generierung konnte eine PKC-Beteiligung sowie eine Beeinflussung durch die PLC (PhospholipaseC) nachgewiesen werden (Lim et al. 1997).

Eine hypothetische Signaltransduktionskaskade der Quarz induzierten ROS-Generierung ist in *Abb. 4.5.1* zusammenfasst. Aus der Kombination der Ergebnisse dieser Studie mit dem in der Literatur beschriebenen molekularen Mechanismus der ROS-Bildung könnte die Quarz-induzierte ROS Generierung wie folgt ablaufen. Nach der Rezeptor-Liganden-Interaktion wird eine Signalkette eingeleitet, die über die Aktivierung von Syk, PI3K, Rac1 und Cdc42 unter der Beteiligung von Aktin zur Komplexierung und Aktivierung der NADPH-Oxidase führt. Diese katalysiert dann die Generierung von ROS. Die Manifestierung dieser Hypothese bedarf allerdings noch einiger Studien. So könnte beispielsweise der dargestellte Signalweg durch den Einsatz von Inhibitoren wie Wortmanin (PI3K) oder NSC23766 (Rac1) näher untersucht werden. In dieser Studie konnte nur ein erster Hinweis darauf gefunden werden, dass Aktin aktiv an diesem Prozess beteiligt sein könnte.



**Abb. 4.5.1:** Mögliche DQ12-induzierte Signaltransduktion in NR8383-Zellen zur ROS Generierung.

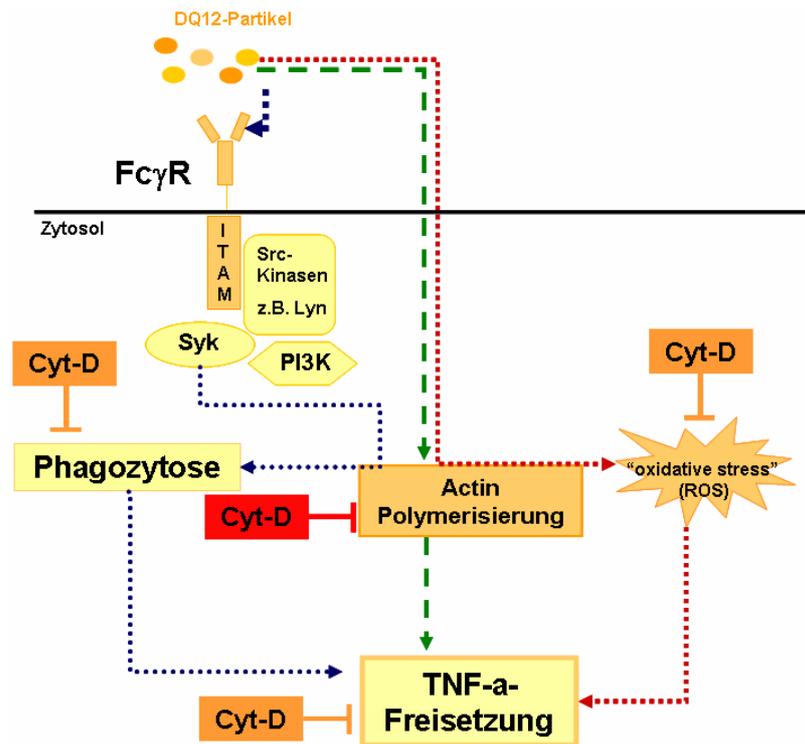
Auch die Freisetzung von TNF- $\alpha$  wird durch die Inhibition des Aktinzellskeletts mit Cyt-D vollständig unterdrückt. Ebenso führt die Inkubation mit dem spezifischen Fc $\gamma$ R-Antikörper zu einer TNF- $\alpha$ -Freisetzung, die mit der DQ12-induzierten vergleichbar ist. Dies könnte auf eine von Castranova (2004) referierte Abhängigkeit der Transkription der Zytokingene von der ROS-Generierung hin deuten. Demnach induziert Quarz die Bildung von ROS, welche gefolgt von Tyrosin-Kinasen Aktivierungen (z.B. PI3K) zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B führt. NF- $\kappa$ B wird in den Zellkern transloziert, wodurch die Transkription verschiedener inflammatorischer Gene, unter anderem auch von TNF- $\alpha$ , ein geleitet wird (Castranova 2004, siehe auch *Abb. 1.2.3.1*). Die ROS-Bildung allein scheint aber in AM nicht ausreichend für die Aktivierung der NF- $\kappa$ B induzierten Transkription zu sein. So führt eine Belastung mit ROFA (residual fly ash) in adherenten, humanen AM zur Bildung von ROS, doch erfolgt weder eine Translokalisierung des NF- $\kappa$ B (p50/65, p50/50) noch eine Bildung von IL-8 (Mondal et al. 1999).

Hier könnte die Beteiligung einer rezeptorvermittelten Signaltransduktionkaskade das fehlende Glied in der ROS-Bildungskette sein. Demnach hätten die Phagozytosemediatoren und die von ihnen ausgehende Signaltinduktion einen entscheidenden Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Bildung und/oder Freisetzung. Unter dieser Betrachtung wäre die Aufnahme selbst entscheidend. Für diese Hypothese spricht auch, dass die Beteiligung vieler hier aufgeführter, während der DQ12-Phagozytose aktivierter Signalmediatoren an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachgewiesen werden konnten. So sind z.B. Src-Kinasen an der Quarz-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt. Die Inhibition dieser hemmt die für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B nötige Phosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$  und p65NF- $\kappa$ B (Kang et al. 2006). Die Inhibition der während der TiO<sub>2</sub>-Belastung in J774A.1 Zellen aktivierten Src-Kinase Lyn führt zur Unterdrückung der Phagozytose wie auch zur Hemmung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung (Palmbos et al. 2002). Dies spricht ebenfalls für die Notwendigkeit der Partikelaufnahme für die TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Auch Syk und PI3K wird eine Beteiligung an der Regulierung der Zytokinproduktion zugesprochen (Berton et al. 2005, Chen et al. 2005, Crespo 2005). Die Fc $\gamma$ R-vermittelte inflammatorische Genexpression kann über Src und NF- $\kappa$ B oder über Syk, Ras und ERK1/2 (Extrazellulär Signal Regulierte Kinasen) induziert werden (Song et al. 2004). Die GTPasen Rac1 und Cdc42, die entscheidend für die Umstrukturierung des Aktinzellskeletts während der Fc $\gamma$ R-medierte Phagozytose sind, scheinen dagegen nicht an der NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression beteiligt zu sein (Lee et al. 2000).

Eine weitere Erklärung für die Inhibition der DQ12-induzierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Cyt-D könnte eine Aktin-vermittelte Bildung von TNF- $\alpha$  sein. Des weitern könnte der Transport aus der Zelle durch das Zellskelett koordiniert werden. Die Abhängigkeit der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung und Bildung von einem intakten Aktinzellskelett konnte bereits in einer Mischkultur aus suspendierten und adherenten primären humanen Monozyten gezeigt werden. LPS-induziert setzen die adherenten Monozyten eine weitaus höhere Menge TNF- $\alpha$  frei als die nicht-adherenten. In der adherenten Monozyten-Fraktion wird, durch die Inhibition der Aktinpolymerisation mittels Cyt-D, die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Transkription, -Expression und -Freisetzung sowie die Aktivierung von ERK1/2 vollständig unterbunden. In der Suspensionskultur der Monozyten dagegen ist die TNF- $\alpha$ -Freisetzung mit Cyt-D nicht zu unterbinden (Rosengart et al. 2002). Demnach könnte Aktin ein vermittelnder Faktor in der Signaltransduktionkaskade der TNF- $\alpha$ -Bildung sein. Umgekehrt beeinflusst TNF- $\alpha$  das Aktinzellskelett. Dabei wird die Aktinpolymerisation über die TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung von Rac, Cdc42 und Rho gesteuert (Wojciak-Stothard et al. 1998). Dies spricht für einen möglichen Einfluss des Aktinzellskeletts auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Doch auch hier müssen, um eine eindeutige Aussage machen zu können, weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Mittels RT-PCR könnte z.B. eine tatsächliche Beteiligung von Aktin an der TNF- $\alpha$ -Synthese oder die vermittelnde Rolle im TNF- $\alpha$ -Transport aus der Zelle analysiert werden.

Aus den Untersuchungen dieser Studie ergeben sich somit 3 mögliche Abhängigkeiten der TNF- $\alpha$ -Freisetzung (Abb. 4.5.2):

1. Abhängigkeit von ROS, dessen Bildung durch die Inhibition der Aktinpolymerisation verhindert wird;
2. Abhängigkeit von der Aufnahme, wobei die DQ12-Phagozytose von einem funktionstüchtigen Aktinzellskelett abhängig ist;
3. Direkte Aktinabhängigkeit, wobei Aktin selbst als intrazellulärer Vermittler an der TNF- $\alpha$ -Bildung oder am TNF- $\alpha$ -Transport aus der Zelle beteiligt sein könnte.



**Abb. 4.5.2:** Mögliche Abhängigkeit der DQ12 induzierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung von:  
 1. ROS-Generierung ..... ; 3. Phagozytose ..... in NR8383-Zellen; 3. Actin - - - .

Aus der Untersuchung der pro-inflammatorischen Antwort auf die DQ12-Belastung ergibt sich ein hypothetischer Mechanismus der Entzündungsinduktion. Die Induktion der intra- wie auch extrazellulären ROS-Bildung, sowie der TNF- $\alpha$ -Freisetzung während DQ12-Phagozytose könnte dabei unter Beteiligung des F-Aktin, des Fc $\gamma$ RII und der nachfolgend aktivierten Fc $\gamma$ R-Signalkette erfolgen. Dies sind erste Hinweise, die in einer späteren Studie zur Klärung des Mechanismus der Endzündungsinduktion führen könnten.

#### **4.6 Ist die DQ12-Phagozytose FcγRII vermittelt? Eine abschließende Diskussion der DQ12-Phagozytose.**

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Aufnahme unter Inhibition der Rezeptoren sowie die Immunohistochemie brachten den FcγRII als den für die DQ12 Phagozytose in NR8383 Zellen am stärksten verantwortlichen Phagozytoserezeptor hervor. Des Weiteren konnte der Rezeptor in der Analyse der Aktivierung der FcγR-Signaltransduktionskette und durch zahlreiche Inhibitionen einzelner Komponenten dieser Signalkaskade spezifiziert werden. Allerdings gibt es Hinweise aus der Literatur, dass auch ein anderer Rezeptor - der ScR - für die Aufnahme von Quarz, wie auch anderer Partikel verantwortlich sein könnte. So konnte Kobzik (1995) durch eine umfassende Untersuchung die Inhibition der Aufnahme unterschiedlicher Partikel (fluoreszierende Latex-beads, α-Quarz, TiO<sub>2</sub>, FeO<sub>3</sub> mit einem Durchmesser um 1µm) durch verschiedene ScR-Liganden (Poly-I, Chondroitinsulfat (Chond-S), Dextransulfat (Dex-S) und Dextran (Dex-T500)) in Hamster-AM zeigen. Die Aufnahme von DEP konnte dagegen nicht inhibiert werden. Die gezeigte Inhibition der α-Quarz-Aufnahme durch den ScR-Liganden Poly-I konnte ebenfalls *in vitro* in humanen AM, sowie *in vivo* an Mäusen durch simultane Instillierung von Inhibitor und Partikel demonstriert werden (Kobzik 1995). Der Einsatz eines spezifischen Antikörpers gegen den Makrophagen Scavenger Rezeptor (MARCO) führte in COS-Zellen wie auch in Mäuse-AM zu einer deutlichen Reduktion der TiO<sub>2</sub>-Aufnahme (Palecanda und Kobzik 2000). Des Weiteren konnte an ScR Klasse A (I/II) null Mäusen, eine Beteiligung des ScR sowohl an der Clearance wie auch an der Entzündungsreaktion und der Entwicklung der Fibrose nach Quarzexposition beobachtet werden (Beamer und Holian 2005). AM von MARCO -/- Mäusen wiesen ebenfalls eine verminderte Aufnahmekapazität von TiO<sub>2</sub> auf, und die exponierten Mäuse zeigten eine verstärkte Entzündungsreaktion (Arredouani et al. 2004, 2006). Weitere Untersuchungen der Rolle des ScR in der pathogenen Wirkung von Partikelexpositionen demonstrierten eine Beteiligung des ScR an der Quarz-induzierten Zelltoxizität und Apoptose (Hamilton et al. 2000, Chao et al. 2001). Eine andere Gruppe konnte allerdings zeigen, dass die über einen Abfall an ATP untersuchte TiO<sub>2</sub>-induzierte Zelltoxizität über einen ScR involvierenden Mechanismus abläuft, wohingegen die Quarz-induzierte Zelltoxizität vom ScR unabhängig ist (Kim et al. 1999). Somit scheint der ScR sowohl für die Aufnahme von nicht opsonierten Partikeln wie auch an der Regulierung der Immunantwort nach Partikelexposition beteiligt zu sein.

Eine Ursache für die kontroversen Beobachtungen im Vergleich zu dieser Studie könnten Opsonierungseffekte aufgrund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen sein. Die Untersuchungen dieser Studie wurden, mit Ausnahme der ROS-Generierung, in Vollmedium durchgeführt, wohingegen bei den Aufnahmestudien der Gruppe um Kobzik in BSS+ (Balanced salt solution, +Ca<sup>2+</sup>) gearbeitet wurde. Zudem ist die Aufnahme über den ScR von

ihnen als Phagozytose von unopsonierten Partikeln beschrieben (Kobzik 1995, Palecanda und Kobzik 2000, Palecanda und Kobzik 2001, Arrendouani et al. 2005). Diese unterschiedlichen Versuchsbedingungen könnten die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Während es bei Kobzik und Mitarbeiter zu keiner Opsonierung der Partikel gekommen sein dürfte, könnten in der hier verwendeten Versuchsanordnung Opsonierungen durch die zahlreichen Proteine, wie z.B. Immunglobuline (Ig, im speziellen IgG), aus Medium und Serum aufgetreten sein. Für einen solchen Opsonierungseffekt spricht auch die Beobachtung, dass Plasma-behandelte kristalline Quarzpartikel in geringem Masse an CR3b (Opsoninierung für die CR Erkennung) und im hohen Masse an IgG, IgA und IgM binden. Des weiteren führt eine Vorbehandlung pro-monozytischer Zellen (U937) mit Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) zu einer erhöhten Expression von Fc $\gamma$ RI wie auch CR3 und CR4, die zu einer erhöhten Phagozytoserate von Plasma behandelten im Gegensatz zu nativen kristallinen Quarzpartikeln führt (Hetland et al. 2000). Dies erinnert an das Inhibitionsmuster in *Abb. 3.3.1.4.*, und spricht für die Aufnahme von Quarz über den Fc $\gamma$ R und im geringeren Maß auch über den CR3 nach einer möglichen Opsonierung des DQ12 mit IgG oder CR3b.

Die Abhängigkeit der durch die Exposition gegenüber Latex Beads in AM induzierten TNF- $\alpha$ - und MIP-2-Freisetzung sowie die ROS Generierung von Opsonierungseffekten (Kobzik et al. 1990, 1993) spricht ebenfalls für eine Opsonierung der in dieser Studie eingesetzten Partikel. Die in NR8383 Zellen durch die Belastung mit DQ12, wie auch durch den Einsatz des Fc $\gamma$ RII-Antikörper beobachtete TNF- $\alpha$ -Freisetzung und ROS-Generierung (Kapitel 3.4) sprechen ebenfalls für einen Opsonierung mit IgG. Die Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren könnte demnach auf einer spezifischen Rezeptor-Partikel-Wechselwirkung beruhen, wie sie nach einer Opsonierung auftritt. Die Unterschiede in den Ergebnissen, der für die Partikel-Phagozytose verantwortlichen Rezeptoren könnte also auf unterschiedliche, durch die Versuchsanordnung bedingte Opsonierungseffekte begründet sein. Bei der Messung der ROS-Produktion wurde in dieser Studie zwar auch in einer Pufferlösung gearbeitet, doch wurden die Zellen in Medium herangezogen, sodass es in der Wachstumsphase zu Anbindung von Opsoninen an die Zellen gekommen sein könnte, die auch über den Waschvorgang stabil blieb. Unterstützt wird diese Hypothese durch Hinweise auf eine Beteiligung der Immunglobuline an der Reaktion auf Partikelbelastungen. DQ12 induziert in Balb/c-Mäusen die Produktion von IgE- wie auch IgG-Antikörpern, die durch PVNO, welches die Quarzentzündungsinduktion vermindert, verhindert werden kann (Mancino et al. 1983). Eine Vorinkubation mit IgG erhöht die Bioreaktivität von Quarz in AM, die darauf mit einer erhöhten ROS-Generierung reagieren (Perkins et al. 1991). Für eine abschließende Konklusion müsste aber auch dies noch überprüft werden. Dafür könnte man DQ12 mit Medium inkubieren und Bindungspartner proteinbiochemisch z.B. im Western-Blot oder mit Hilfe von HPLC untersuchen.

Auch die beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der  $\text{TiO}_2$ -Aufnahme, im Gegensatz zur  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Aufnahme von  $\alpha$ -Quarz oder DEP (Kobzik 1995, Palecanda und Kobzik 2000), spricht für unterschiedliche Aufnahmemechanismen der verschiedenen Partikel. So könnte die Aufnahme von  $\text{TiO}_2$   $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig über MARCO ablaufen, wohingegen Quarz über den FcR  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig (beschrieben in Kapitel 4.4) aufgenommen wird. Die anderen beschriebenen Effekte des ScR, z.B. auf Apoptose und Entzündung, könnten auf modulatorische oder unterstützende Funktionen des ScR zurückzuführen sein. Da bisher aber noch keine genauen Kenntnisse darüber vorliegen welche Möglichkeiten der ScR zur Signalweiterleitung hat, kann darüber keine Aussage gemacht werden. Eine weitere Beobachtung, die für eine Fc $\gamma$ R vermittelte Phagozytose spricht ist, dass durch die Exposition gegenüber verschiedenen Partikeln unter anderem auch die FcR-vermittelte Phagozytose herabgesetzt wird (Ohtsuka et al. 2000). Dies könnte als ein indirektes Indiz dafür angesehen werden, dass die Partikelaufnahme über den FcR abläuft, der nach der Partikelphagozytose für die Aufnahme roter Blutzellen nicht mehr verfügbar ist.

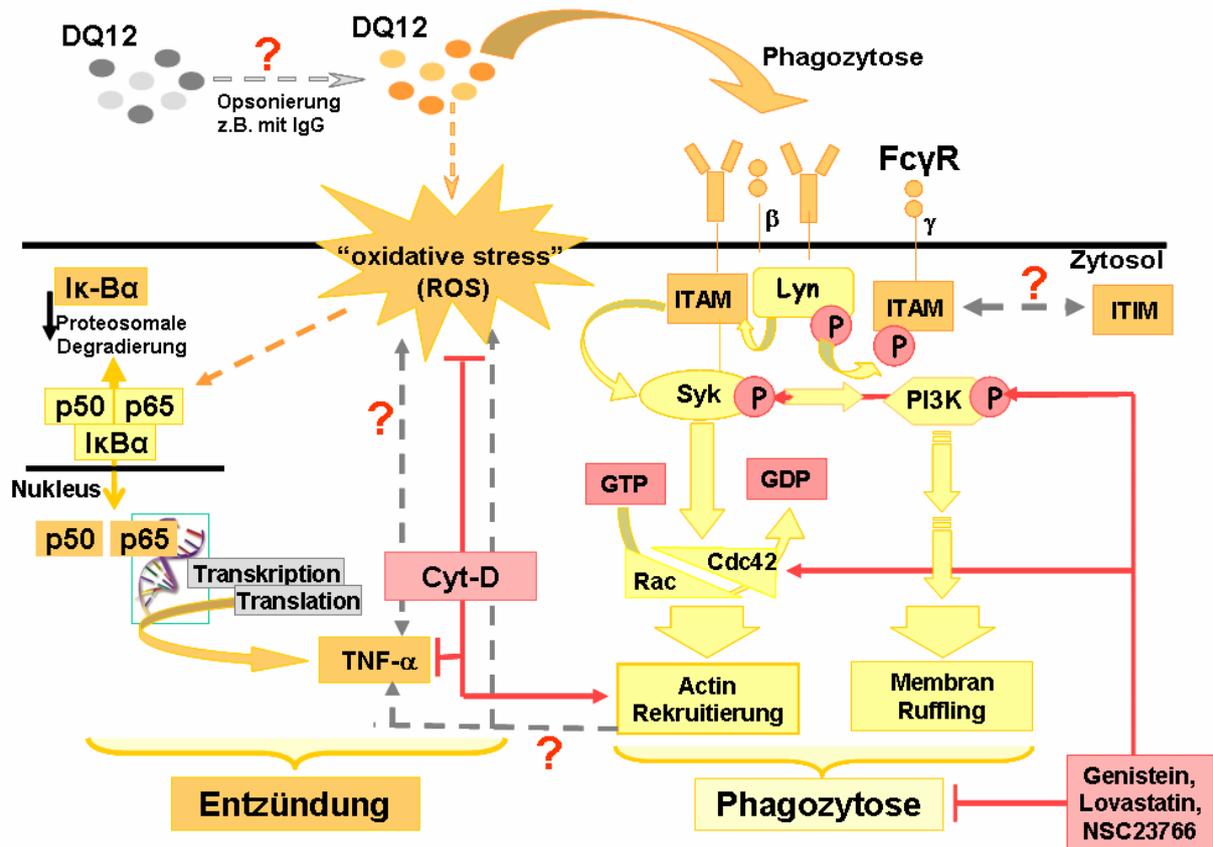
Eine weitere Möglichkeit für die Kontroverse der Ergebnisse zwischen FcR und ScR könnten die unterschiedlichen Zellsysteme oder Partikel sein. Die Untersuchung des DQ12-Aufnahmemechanismus dieser Studie wurde an NR8383 Zellen durchgeführt, wohingegen die meisten anderen Gruppen mit primären AM gearbeitet haben. Der Mechanismus der DQ12-Aufnahme über den Fc $\gamma$ R muss also als Zell- und Partikel spezifisch angesehen werden. Eine allgemein gültigere Aussage bedarf noch weiterer Untersuchungen mit anderen Zelltypen und Partikeln, welche in Zukunft durchgeführt werden sollen. Ebenfalls soll in weiteren Untersuchungen unter Verwendung von siRNA der Aufnahmemechanismus und die Entzündungsinduktion über den FcR durch einen knockdown in NR8383 manifestiert werden. Einen noch besseren Einblick würden Versuche mit FcR(-/-) Mäusen liefern, die ebenfalls geplant sind.

Biologische Relevanz des hier gezeigten Mechanismus der DQ12-Aufnahme ergibt sich daraus, dass die hier künstlich durch das Medium hervorgerufene DQ12 Oponierung in der Lunge durch Surfactantproteine und darin enthaltener Immunglobuline erfolgen könnte. Das Surfactant ist eine die Alveolen auskleidende Schicht, die zum einen dazu dient die Oberflächenspannung an der Gas/Flüssigkeits-Interphase zu reduzieren um einen Lungenkollaps zu verhindern, zum anderen aber auch eine wichtige Aufgabe in der Abwehr gegen Pathogene erfüllt. Dabei können Komponenten des Surfactants, wie Proteine oder Phospholipide mit alveolaren Zellen, inhalierten Partikeln oder Mikroorganismen interagieren, die zur Modifikation der pulmonalen Immunantwort führen (Johansson et al. 1994, Pison et al. 1994, McCormack und Whitsett 2002). Die Hauptkomponente des Surfactant ist SP-A (pulmonary Srfactant Protein-A), welches sowohl die FcR- als auch die CR1-vermittelte Phagozytosekapazität erhöht (Tenner et al. 1989). Des Weiteren konnte die Beeinflussung

der Phagozytose durch das Surfactant in NR8383 Zellen gezeigt werden. So inhibieren Phospholipidkomponenten des Surfactants die Aufnahme von Mikrosphären (Jones et al. 2002). Des Weiteren konnte durch die Opsonierung von TiO<sub>2</sub> mit Sp-A oder IgG die Aufnahme der Partikel durch AM merklich erhöht werden (Stringer und Kobzik 1996).

Abschließend lässt sich aus der exemplarischen Untersuchung mit DQ12-Partikeln folgende in *Abb. 4.6.1* zusammengefasste Hypothese der molekularen Mechanismen für Aufnahme und inflammatorische Antwort aufstellen:

Unter den experimentellen Bedingungen erfolgt die Aufnahme von DQ12 in NR8383 Makrophagen hauptsächlich über einen FcR-abhängigen Mechanismus. Unterschiede zu den Befunden anderer Studien lassen sich am wahrscheinlichsten durch Opsonierungseffekte erklären. Demnach würde zunächst eine Opsonierung des DQ12 mit Komponenten des Mediums stattfinden, vermutlich hauptsächlich mit IgG, worauf es zur spezifischen Rezeptor-Partikel-Erkennung, gefolgt von der FcγR vermittelten Phagozytose unter der Aktivierung von Lyn, Syk, PI3K und den GTPasen Rac1 und Cdc42 käme. Dieses phagozytotische Signal wird vermutlich über die ITIM-Domäne reguliert oder von der Verfügbarkeit des Rezeptors an der Zelloberfläche beeinflusst. Es folgt die Induktion der ROS-Generierung wie auch der Freisetzung von TNF-α, die von der F-Aktinkomponente des Zellskeletts abhängig ist.



**Abb. 4.6.1:** Hypothetischer Mechanismus der DQ12 Phagozytose sowie der Partikel induzierten ROS-Generierung und TNF- $\alpha$ -Freisetzung.

---

## Kapitel 5: Zusammenfassung und Ausblick

Durch den Einsatz der Modellpartikel DQ12, feinem und ultra-feinem TiO<sub>2</sub> wie CB, sowie der technologisch hergestellten SWNT's, die sich durch ihre konsistente Größen- und Komponentenverteilung auszeichnen, wurden in dieser Studie grundlegende und umwelt- sowie arbeitsmedizinisch relevante Untersuchungen des Mechanismus der Partikelaufnahme durchgeführt, die auch den neu entstandenen nano-technologischen Bereich abdecken. Dabei erfolgten die meisten Untersuchungen der verschiedenen Partikel in einem nicht zelltoxischen Dosenbereich (bis zu 40µg/cm<sup>2</sup> bzw. 30µg/ml SWNT's). Die in einer umfassenden toxikologischen Untersuchung ermittelte zelltoxische Wirkung der verschiedenen Partikel könnte von Partikel-spezifischen Interaktionen mit den Zellen, die unter anderem auch die Induktion der ROS-Generierung und/oder die Partikelaufnahme beeinflussen, hervorgerufen sein. Obwohl die verwendeten Partikelkonzentrationen im Vergleich zu der tatsächlichen Umwelt- oder Arbeitsplatzbelastung sehr hoch erscheinen, sind sie dennoch für eine mechanistische Studie zu tolerieren. Sie liegt des Weiteren unter der Konzentration vieler anderer *in vitro* Studien.

Nach erfolgreicher Etablierung der durchflusszytometrischen Analyseverfahren zur Untersuchung der Partikelaufnahme, wurde in einem Vergleich der Internalisierungsrate an primären alveolären Makrophagen mit NR8383 Zellen gezeigt, dass die Zelllinie ein geeignetes *in vitro* Modell darstellt. Die dabei ermittelte unterschiedliche DQ12-Aufnahmerate bei AM und IM könnte auf eine unterschiedliche Funktionalität als Folge einer gewebespezifischen Differenzierung zurückzuführen zu sein. Weitere Untersuchungen, wie z.B. der Immunfunktion (Zytokin-, Chemokin-, ROS-Freisetzung und -Bildung, Membranoberflächenepitopen), der beiden Makrophagenpopulationen könnten zukünftig zur Unterstützung dieser Aussage durchgeführt werden. Auch die Unterschiede in der Aufnahmekapazität zwischen AM älterer und jüngerer Tiere, die auf den Entwicklungsstatus des Immunsystems begründet sein könnte, bedarf einer weiteren Studie.

**Das zentrale Ziel dieser Arbeit war jedoch die Klärung der Mechanismen der Partikelaufnahme in alveolären Makrophagen und die Untersuchung der daraus folgenden Konsequenzen auf die Endzündungsantwort.**

Ein inhibitorischer Ansatz führte zunächst zu Klärung der ersten Frage:

**(i) *Ist die Partikelaufnahme eine klassische Aktin vermittelte Phagozytose?***

Durchflusszytometrisch konnte durch Inhibition des Aktinzytoskellets mittels Cyt-D gezeigt werden, dass sowohl die Partikelaufnahme von DQ12 sowie von CB (fein) und TiO<sub>2</sub> (fein und ultrafein) in NR8383 Zellen einer klassischen Aktin vermittelten Phagozytose entspricht. Eine Aktin-Immunohistochemie, welche die Rekrutierung des F-Aktins in die sich ausbildenden

Pseudopodien und Phagosomen sowie zu den Partikelbindungsstellen demonstrierte, bestätigte dieses Ergebnis für DQ12. Des Weiteren lieferte dieser Ansatz einen ersten Hinweis, dass auch die Aufnahme der SWNT's Aktin vermittelt sein könnte. Dies sollte aber in einer näheren inhibitorischen Untersuchung der Aufnahme mittels NIR-Spektroskopie in Kooperation mit der RICE Universität spezifiziert werden.

Ein folgender Untersuchungsansatz führte durch die durchflusszytometrische Untersuchung der DQ12-Aufnahme nach der Inhibition der klassischen Phagozytoserezeptoren FcR, MR, CR wie ScR und durch eine FcR-, MR-, CR-Immunohistochemie zur Klärung der zweiten spezifischen Frage:

**(ii) Wenn DQ12 phagozytiert wird, welcher der klassischen Phagozytose-Rezeptoren ist dann an der Erkennung und Aufnahme der Partikel beteiligt?**

In diesem ersten Untersuchungsansatz konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich der FcγRII für die DQ12-Phagozytose verantwortlich zu sein scheint. Allerdings kann auch eine Beteiligung weiterer klassischer Phagozytoserezeptoren, wie dem MR und dem CR nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zur Spezifizierung des FcγRII als DQ12-Phagozytose vermittelnder Rezeptor wurde die für diesen Rezeptor bekannte Signaltransduktionskette untersucht. Zunächst wurde in der Untersuchung des Aktivierungsstatus der GTPasen Cdc42, Rac und Rho mittels eines Pulldown-Assays gefolgt von Western Blot Analysen demonstriert, dass die DQ12-Aufnahme einer TypII-Phagozytose unter der Aktivierung von Cdc42 und Rac, ohne Beteiligung von Rho entspricht, welche typisch für die Phagozytose über den FcR ist. In weiteren Western Blot Ansätzen mit phosphospezifischen Antikörpern konnte der, in der Literatur beschriebenen FcR-Signaltransduktionskaskade folgend, die Aktivierung der Kinasen Lyn, Syk sowie PI3K DQ12-induziert gezeigt werden. Dabei wurde, wie auch schon bei den GTPasen ein zeitabhängiges Aktivierungsmuster beobachtet, welches auf die Verfügbarkeit des Rezeptors oder ein inhibitorisches Signal zurückzuführen sein könnte. Eine Western Blot Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern gegen das inhibitorische Motiv (ITIM) des FcγRIIB scheint die Aktivierung eines inhibitorischen Prozesses zu bestätigen und die zyklisch auftretende DQ12 Phagozytose zu erklären.

Eine durchflusszytometrische Untersuchung der FcR-Signalkette über die Inhibition verschiedener Phagozytosemediatoren, wie den Phospho-Tyrosin-Kinasen sowie GTPasen und spezifisch der GTPase Rac1, konnte in einer zweiten unabhängigen Methode die FcγRII-vermittelte Phagozytose bestätigen.

Die Untersuchung des Aktivierungsmusters sowie die Reduktion der Aufnahme durch die Inhibition Phagozytosemediatoren zeigen die Abhängigkeit der DQ12-Aufnahme von der FcγRII-induzierten Signaltransduktionskaskade. Daraus ergibt sich eine FcγRII-vermittelte DQ12-Phagozytose. Hierbei könnte zunächst eine Opsonierung der Quarzpartikel durch im

Medium enthaltene IgG's erfolgen, welche die DQ12-Partikel für die Erkennung durch den FcγRII markiert (opsoniert). Die Untersuchung ob DQ12 mit den Komponenten des Mediums reagiert, könnten das erfolgen von Opsonierungseffekten bestätigen. Des Weiteren sollen zukünftige Untersuchungen der Aufnahme unter Verwendung von FcγRII spezifischer siRNA in NR8383 Makrophagen und FcγRII(-/-)-Mäusen *in vitro* und *in vivo* zur eindeutigen Klärung des Aufnahmemechanismus führen. Ebenso sollen die Arbeiten mit den feinen und ultrafeinen Partikeln sowie den SWNT's fortgeführt werden um auch hier einen vollständigen Aufnahmemechanismus darstellen zu können.

Eine abschließende Untersuchung befasste sich mit der letzten Frage:

**(iii) Welche Bedeutung hat der Aufnahmemechanismus auf die Entzündungswirkung von Partikeln?**

In diesem letzten Teil der Arbeit wurde zunächst die gesamt, intra- und extrazelluläre ROS-Generierung mittels Chemilumineszenz (Lucigenin), Durchflusszytometrie (DHR) und der ESR-Spektroskopie (DMPO), sowie die Aktivierung des NF-κB Weges und die TNF-α-Freisetzung immunohistochemisch, durch Western Blot Analysen und ELISA-Technik exemplarisch als pro-inflammatorische Reaktion der NR8383 Makrophagen auf eine DQ12-Belastung gezeigt. Der Einsatz der Aktinzytoskelettinhibitors Cyt-D konnte zudem eine Abhängigkeit der ROS-Generierung von der Partikelaufnahme oder dem Zytoskelett demonstrieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die TNF-α-Freisetzung von der DQ12-Aufnahme, der ROS-Generierung oder der Funktionalität der Aktinkomponente des Zellskeletts selbst abhängig ist. Auch hier sollen weitere Untersuchungen z.B. mit NADPH-Oxidase Inhibitoren den genauen mechanistischen Prozess klären. Eine letzte Untersuchung konnte zeigen, dass der spezifische FcγRIIB-Antikörper eine quantitativ ähnliche pro-inflammatorische Reaktion (ROS-Generierung, TNF-α-Freisetzung) in NR8383-Zellen hervorruft.

Aus dieser Studie geht ein FcγRII-vermittelter DQ12 Aufnahmemechanismus hervor. Dieses Ergebnis könnte zukünftig in der Medizin zum Einsatz kommen. Medizinisch angewandt, und auch auf andere Partikel wie den Umweltstäuben bezogen, könnten diese Resultate einen Beitrag in der Therapie und Prävention von partikelinduzierten Lungenerkrankungen, wie chronische Entzündung, Fibrosen, COPD und Krebs leisten. Die Ergebnisse der SWNT-Aufnahme wie auch der Aufnahme der ultrafeinen Partikel bieten zudem einen ersten Ansatz zur medizinischen Nutzung der Nanotechnologie. Die Anwendung dieser Technologie in der medizinischen Diagnose und Therapie ist jedoch erst in den Anfängen und Bedarf noch vieler genauerer toxikologischer und mechanistischer Untersuchungen wie dieser bevor sie voll zum Einsatz kommen kann.



---

## 6. Referenzen

- Aderem A., Underhill D.M. 1999, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol 17: 593-623
- Aderem A. 2003, *Phagocytosis and inflammatory response*. JID 187(2): 340-345
- Afaq F., Abidi P., Matin R., Rahman Q. 1998, *Cytotoxicity, Pro-oxidant Effects and Antioxidant Depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine Titanium Dioxide*. J Appl Toxicol 18: 307-312
- Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. 1987, *Genistein, a specific Inhibitor of Tyrosin-specific Protein Kinases*. Journal Biol Chem 262(12): 5592-5595
- Albrecht C., Borm P.J., Adolf B., Timblin C.R., Mossman B.T. 2002, *In vitro and in vivo activation of extracellular signal regulated kinases by coal and quartz silica*. Toxicol Appl Pharmacol 184 (1):37-45
- Albrecht C., Schins R.P.F., Höhr D., Becker A., Shi T., Knaapen A.M., Borm P.J.A. 2004, *Inflammatory time course after Quartz Instillation. Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Particle surface*. Am Resp Cell Mol Biol 31: 292-301
- Albrecht C., Knaapen A.M., Becker A., Höhr D., Haberzettl P., van Schooten F.J., Borm P.J.A., Schins R.P.F. 2005, *The crucial Role of particle surface reactivity in respirable quartz -induced reactive oxygen /nitrogen species formation and APE/Ref-1 induction in rat lung*. Resp Research 6: 129
- Albrecht C., Höhr D., Haberzettl P., Becker A., Borm P.J.A., Schins R.P.F. xxxx, *The role of particle surface and particle-macrophage-interactions quartz-induced inflammation and lung clearance*. Inhalation Toxicology, submitted
- Allen L.A., Aderem A. 1996, *Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and Fc receptor mediated phagocytosis in macrophages*. J Exp Med 184(2): 627-637
- Apodaca G. 2001, *Endocytotic traffic in polarized epithelial cells: Role of the Actin and Microtubule Cytoskeleton*. Traffic 2: 149-159
- Araki N., Johnson M.T. Swanson J.A. 1996, *A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages*. J Cell Biol 135: 1249-1260
- Arredouani M.S., Yang Z., Ning Y.Y., Quin G., , Soinenen R., Tryggvason K., Kobzik L. 2004, *The Scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles*. J Exp Med 200 (2): 267-272

- Arredouani M.S., Palecanda A., Koziel H., Huang Y.-C., Imrich A., Sulahian T.H., Ning Y.Y., Yang Z., Pikkarainen T., Sankala M., Vargas S.O., Takeya M., Tryggvason K., Kobzik L. 2005, *MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages*. Jour Immunol 175: 6085-6064
- Arredouani M.S., Yang Z., Imrich A., Ning Y.Y., Quin G., Kobzik L. 2006, *The macrophage scavenger receptor SR-AI/II and lung defense against is the major pneumococci and particles*. Am J Resp Cell Mol Biol xxx, xxx
- Balduzzi M., Diociaiuti M., Berardis de B., Paradisi s., Paoletti L. 2004, *In vitro effects on macrophages induced by noncytotoxic doses of silica particles possibly relevant to ambient exposure*. Environmental Research 96: 62-71
- Baldwin A.S., Jr. 2001, *The transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease*. J of Clinical Investigation 107(1): 3-6
- Barbarin V., Nihoul A. Misson P., Arras M., Delos M., Leclerq I., Lison D., Huaux F. 2005, *The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis*. Resp Research, 6:112
- Barbior B. 1999, *NADPH Oxidase: An Uptake*. Blood 93(5): 1464-1476
- Bar-Sagi D., Hall A. 2000, *Ras and Rho GTPases: A Family Reunion*. Cell 103: 227-238
- Beamer C.A., Holian A. 2005, *Scavenger Receptor Class A Type I/II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 298: L186-L195
- Becker S., Soukup J.M. 1998, *Decreased CD11b Expression, phagocytosis, and oxidative burst in urban particulate-exposed human monocytes and alveolar macrophages*. J Toxicol Environ Health 55(7): 455-477
- Becker S., Soukup J.M. 2003, *Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine and coarse urban air pollution particles*. Exper Lung Research 29: 29-44
- Becker S., Dailey L.A., Soukup J.M., Grambow S.C., Devlin R.B., Huang Y.-C. T. 2005, *Seasonal Variations in Air Pollution Particle-Induced Inflammatory Mediator Release and oxidative Stress*. Environ Health Perspect 113(8): 1032-1038
- Ben-Neriah Y., Schmitz M.L. 2004, *Of mice and men. Meeting on the biology and pathology of NF- $\kappa$ B*. EMBO 5(7): 668-673
- Bermudez E., Magnum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Wahrheit D.B., Everitt J.I. 2004, *Pulmonary responses of mice, rats , and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles*. Toxicological Science 77: 347-357

- 
- Bey E.A., Xu B., Bhattacharjee A., Oldfield C.M., Zhao X., Li Q., Subbulakshmi A., Feldman G.M., Wientjes F.B., Cathcart M.K. 2004, *Protein Kinase C $\delta$  is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human Monocytes*. J Immunol 173: 5730-5738
  - Bogatu B., Contag B. 2005, *Absorption of Lipoproteins onto mineral dust surfaces: a possible factor in the pathogenesis of particle-induced pulmonary fibrosis*. Z Naturforsch 60 (9-10): 792-798
  - Bolen J.B. 1991, Signal transduction by the Src family of tyrosine protein kinases in hematopoietic cells. Cell Growth Differ 2: 409-414
  - Bonner J.C., Rice A.B., Lindroos P.M. O'Brien P.O., Dreher K.L., Rosas I., Alfaro-Moreno E., Osornio-Vargas A.R. 1998, *Induction of the Lung Myofibroblast PDGF Receptor by Urban Ambient Particles from Mexico City*. Am J Resp Cell Mol Biol 19: 672-680
  - Borm P.J.A., Höhr D., Steinfartz Y., Zeitträger I., Albrecht C. 2000, Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dust, titanium dioxide, and quartz. Inhalation Toxicology 12(3): 225-231
  - Bowden D.H., Adamson I., Y., R. 1972, *Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages. I. Kinetic studies in normal mice*. Lab Invest 42: 511
  - Bowden D.H., Adamson I., Y., R. 1972, *The pulmonary interstitial cells as immediate precursors of alveolar macrophages*. Am J Pathol 68: 521
  - Bowden D.H. 1984, *The alveolar macrophages*. Environ Health perspectives 55: 327-341
  - Bowler J.W., Bailey R.J., North R.A., Surprenant A. 2003, *P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors on rat alveolar macrophages*. British Journal of Pharmacology 140: 567-575
  - Braga A.L.F., Zanobetti A., Schwartz J. 2000, *Do respiratory epidemics confound the association between air pollution and daily deaths?* Eur Respir J 16: 723-728
  - Brain J.D. 1992, *Mechanisms, Measurement, and Significance of lung macrophage function*. Environ Health Perspec 97: 5-10
  - Brain J.D., Molina R.M., DeCamp M.M., Warner A.E. 1999, *Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species*. Am J Physiol 276 (20): L146-L154
  - Brauer M., Avila-Casado C., Fortoul T.I., Vedal S., Stevens B., Churg A. 2001, *Air Pollution and Retained Particles in the lung*. Environ Health Perspect 109: 1039-1043
  - Brenton G., Mócasi A., Lowell C.A. 2005, *Src and Syk kinases: key regulators of phagocytotic cell activation*. Trends in Immunology 26 (4)

- Brody A. R., Bonner J.C., Overby L.H., Badget A., Kalter V., Kumar R.K., Bennett R.A. 1992, *Interstitial pulmonary macrophages produce platelet-derived growth factor that stimulates rat lung fibroblasts proliferation in vitro*. J Leukoc Biol 51(6): 640-648
- Brown S.B., Murray C.H., Clarke M.C.H., Magowan L. Sanderson H., Savill J. 2000, *Constitutive Death of Platelets leading to scavenger receptor-mediated Phagocytosis*. Jour Biol Chem 275(8): 5987-5996
- Brown D.M., Donaldson K., Borm P.J., Schins R.P., Denhardt M., Gilmour P., Jimenez L.A., 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
- Brown D.M., Donaldson K., Stone V. 2004, *Effects of PM<sub>10</sub> in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages*. Respiratory Research 5: 29
- Cakmak G.D., Schins R.P., Shi T., Fenoglio I., Fubini B., Borm P.J. 2004, *In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz*. Int J Hyg Environ Health 207 (2): 105-113
- Calderon-Guarciduenas L., Devlin R.B., Miller F.J. 2000, *Respiratory tract pathology and cytokine imbalance in clinically healthy children chronically and sequentially exposed to air pollutants*. Med Hypotheses 55(5): 373-378
- Camner P., Lundborg M., L stbom L., Gerde P., Gross N., Jarstrand C. 2002, *Experimental calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages*. J Appl Physiol 92: 2608-2616
- Canetti C., Aronoff D.M., Choe M., Flamand N., Wettlaufer S., Toews G.B., Chen G-W., Peters-Gorden M. 2006, *Different regulation by leukotrienes and calcium of Fc $\gamma$  receptor-induced phagocytosis and Syk activation in dendritic cells versus macrophages*. J of Leukoc Biol 79: xxx-xxx
- Canetti C., Hu B., Curtis J.L., Peters-Gorden M. 2006, *Syk activation is a leukotrieneB<sub>4</sub>-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells*. Blood 102: 1877-1883
- Caron E., Hall A. 1998, *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different rho GTPase*. Science 282: 1717-1721
- Caron E., Self A.J., Hall A. 2000, *The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 by LPS and other inflammatory mediators*. Current Biol 10: 974-978
- Castranova V. 2000, *FROM COALMINE DUST TO QUARTZ: Mechanisms of Pulmonary Pathogenicity*. Inhalation Toxicology 12(3): 7-14

- 
- Castranova V., Porter D., Millecchia L., Ma J.Y., Hubbs A.F., Teass A. 2002, *Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions*. Mol Cell Biochem 234-235: 177-184
  - Castranova V. 2004, *Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: Role of reactive oxygen/nitrogen species*. Free Radical Biology and Medicine 37(7): 916-925
  - Chao S.K., Hamilton R.H., Pfau J.C., Holian A. 2001, *Cell surface regulation of silica induced apoptosis by the SR-A Scavenger Receptor in a murine lung macrophage cell line (MH-S)*. Toxicol Appl Pharmacol 174: 10-16
  - Chen K., Iribarren P., Gong W., Wang J-M. 2005, *The essential Role of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3Ks) in regulating pro-inflammatory response and the progression of cancer*. Cellular and Molecular Immunology 2 (4): 241-252
  - Cherukuri P., Bachilo S.M., Litovsky S.H., Weisman R.B. 2004, *Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytotic cells*. J Am Chem Soc 126
  - Chimini G., Chavrier P. 2000, *Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment*. Nat Cell Biol 2: E191-E196
  - Choi C., Cho H., Park J., Cho C., Sonng Y. 2003, *Suppressive Effects of Genistein on Oxidative Stress and NFkB Activation in RAW 264.7 Macrophages*. Biosci Biotechnol Biochem 67(9): 1916-1922
  - Chootip K., Ness K.F., Wand Y., Gurney A.M., Kennedy C. 2002, *Regional variation in P2 receptor expression in the rat pulmonary arterial circulation*. Brit J Pharmacol 137: 637-646
  - Churg A. 1996, *The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells*. Am J Resp Crit Care Med 154: 1124-1140
  - Churg A., Brauer M. 2000, *Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs*. Ultrastruct Pathol 24 (6): 353-361
  - Clarke R.W., Coull B., Reinisch U., Catalano P., Killingsworth C.R., Koutrakis P., Kavouras I., Murthy G.G.K., Lawrence J., Lovett E., Wolfson J.M., Verrier R.L., Godleski J.J. 2000, *Inhaled Concentrated Ambient Particles are associated with Hematologic and Bronchoalveolar Lavage Changes in Canines*. Envir Health Perpec 108 (12): 1179-1187
  - Clouter A., Brown D., Höhr D., Borm P., Donaldson K. 2001, *Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus DQ12 Quartz: Particle surface correlates*. Toxicol Science 63: 90-98
  - Colvin V.L. 2003, *The potential environmental impact of engineered nanomaterials*. Nature 21 (10): 1166-1170

- Cooper J.A., Howell B. 1993, *The when and how of Src regulation*. Cell 73: 1051-1054
- Cox D., Chang P., Kurosaki T., Greenberg S. 1996, *Syk Tyrosin Kinase is required for Immunoreceptor Tyrosin Activation Motif-dependent Actin Assembly*. J. Biological Chemistry 271 (28): 16597-16602
- Cox D., Chang P., Zhang Q., Reddy P.G., Bokoch G.M., Greenberg S. 1997, *Requirement for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in Leukocytes*. J. Exp.Med. 186 (9): 1487-1494
- Cox D., Tseng C.C. Bjekic G., Greenberg S. 1999, *A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension*. J Biol Chem 274: 1240-1247
- Cox D., Greenberg S. 2001, *Phagocytotic Signaling strategies: Fcy receptor mediated phagocytosis as a model system*. Seminars in Immunology 13: 339-344
- Crespo M.S. 2005, *Immune Complex Processing: A Phagocytosis-Based Mechanism with Proinflammatory Potential*. Transfus Med Hemother 32: 355-362
- Davis B.L., Johnson L.R., Stevens R.K., Courtney W.J., Safriet D.W. 1984, *The quartz content and elemental composition of aerosols from selected sites of the EPA inhalable particulate network*. Atmos Environ 18: 771-782
- Della Bianca V., Grzeskowiak M., Rossi F. 1990, *Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and respiratory burst independent of phospholipids turnover and Ca<sup>2+</sup> transient*. J Immunol 144 (4): 1411-1417
- DHFS, Department of Health & family Services 2003, *Carbon Black*.
- Di A., Nelson D.J., Bindokas V., Brown M.E., Libunao F., Palfrey H.C. 2003, *Dynamin regulates focal exocytosis in Phagocytosing macrophages*. Mol Biol Cell 14: 2016-2028
- Dias N., Niclau a., Carvalho G.S., Mota M., Lima N. 1999, *Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presents of toxicants*. J Basic Microbiol 39(2): 103-108
- Ding M., Chen F., Shi X., Yucesoy B., Mossman B., Vallyathan V. 2002, *Disease caused by silica: mechanisms of injury and disease development*. Int Immunopharmacol 2(2-3): 173-182
- Dini L., Pagliara P., Carlá E.C. 2002, *Phagocytosis of apoptotic cells by liver: A morphological study*. Microcopy Research and Technique 57: 530-540
- Dip K., Anderson T. 2000, *BETA 2 integrin signaling in leukocytes*. Font Biosci 5: 438-451

- 
- Don Porto Carero A., Hoet P.H.M., Verschaeve L., Schoeters G., Nemry 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)*. Environmental and Molecular Mutagenesis 37: 155-163
  - Donaldson K., Borm P. 1998, *The quart hazard: A variable entity*. Ann Occup Hyg 42: 287-294
  - Donaldson K., Tran L., Jimenez L.A., Duffin R., Newby D.E., Mills N., MacNee W., Stone V. 2005, *Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure*. Particle and Fibre Toxicology 2:10
  - Driscoll K.E. (a), Lindenschmidt R.C., Maurer J.K., Higgins J.M., Ridder G. 1990, *Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophages-derived cytokines, and histopathology*. Am J Respir Cell Mol Biol 2 (4): 381-390
  - Driscoll K.E. (b), Maurer J.K., Lindenschmidt R.C., Romberger D., Rennard S.I., Crosby L. 1990, *Respiratory tract response to dust: relationships between dust burden, lung injury, alveolar macrophage fibronectin release and the development of pulmonary fibrosis*. Toxicol Appl Pharmacol 106 (1): 88-101
  - Driscoll K.E., Lindenschmidt R.C., Maurer J.K., Perkins L., Perkins M., Higgins J.M. 1991, *Pulmonary response to inhaled silica or titanium dioxide*. Toxicol Appl Pharmacol 111(2): 201-210
  - Driscoll K.E., Carter J.M., Hassenbein D.G., Howard B. 1997, *Cytokines and Particle-induced Inflammatory Cell Recruitment*. Environ Health Perspec 105 (5): 1159-1164
  - Duffin R., Gilmore P.S., Schins R.P. 2001, *Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression and NF- $\kappa$ B activation*. Toxicol Appl Pharmacol 76:10-17
  - Dunne D.W., Resnick D., Greenberg J., Krieger M., Joiner K.A. 1994, *The type I macrophage receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid*. Proc Natl Acad Sci 91: 1863-1867
  - Dyke van K., Patel S., Vallyathan V. 2003, *Lucigenin chemiluminescence assay as an adjunctive tool for assessment of various stages of inflammation: A study of quiescent inflammatory cells*. J Biosc 28(1):115-119
  - East L., Isacke C.M. 2002, *The mannose receptor family*. Biochimica Biophysica Acta 1572: 364-386
  - Elder A.C., Gelein R., Finkelstein J.N., Cox C., Oberdörster G. 2000, *Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin*. Inhal Toxicol 12 (4): 227-246

- Elder A.C., Gelein R., Finkelstein J.N., Driscoll K.E., Harkema J., Oberdörster G. 2005, *Effects of subchronical inhaled carbon black in three species. I. Retention Kinetics, Lung Inflammation, and Histopathology*. Toxicol Science 88 (2): 614-629
- EPA 1996, *Ambient Levels and Noncancer Health Effects of Inhaled Crystalline and Amorphous Silica*. EPA/600/R-95/115. EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- Ernst J.D. 1998, *Macrophage receptor for mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity 66(4): 1277-1281
- Fathi M., Johansson A., Lundborg M., Orre L., Skold C.M., Camner P. 2001, *Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages*. Exp Mol Pathol 70 (2): 77-82
- Fels A.O., Cohn Z.A. 1986, *The alveolar macrophage*. J Appl Physiol 60(2): 353-369
- Fenoglio I., Fubini B. 2000, *Effect of micromorphology and surface reactivity of several usual forms of crystalline silica on the cytotoxicity to a monocyte-macrophage tumor cell line*. Inhalation Toxicology 12 (3): 81-89
- Ferin J., Oberdörster G., Penney D.P. 1992, *Pulmonary retention of ultrafine and fine Particles in rats*. Am J Respir Cell Mol Biol 6(5): 535-542
- Fitzer-Attas C.J., Lowry M., Cowley M.T., Finn A.J., Meng F., DeFranco A.L., Lowell C.A. 2000, *Fcy receptor mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family kinases Hck, Fgr and Lyn*. J Exp. Med. 191:669-682
- Floyd R.A. 1990, *The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis*. Carcinogenesis 11: 1447-1450
- Forman H.J., Torres M. 2002, *Reactive oxygen species and cell signaling*. Am J Resp Crit Care Med 166: S4-S8
- Framton M.W., Ghio A.J., Samet J.M., Carson J.L., Carter J.D., Devlin R.B. 1999, *Effects of aqueous extracts of PM<sub>10</sub> filters from the Utah Valley on the human airway epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 277 (21): L960-L967
- Franke-Ullmann G., Pfortner C., Walter P., Steinmüller C., Lohmann-Matthes M-L. Kobzik L. 1996, *Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro*. J of Immunol 157: 3097-3104
- Fruman D.A., Cantley L.C. 2002, *Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems*. Immunology 14: 7-18
- Fujiwara N., Kobayashi K. 2005, *Macrophages in inflammation*. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy 4: 281-286
- Gallagher J., Heinrich U., George M., Hendee L., Phillips D.H., Lewtas J. 1994, *Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles*. Carcinogenesis 15: 1291-1299

- 
- Gao Y., Dickerson J.B., Guo F., Zheng J., Zheng Y. 2004, *Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor*. PNAS 101(20): 7618-7623
  - Garcia-Campaña A.M., Baeyens W.R.G., Zhang X., Alés F., Gámiz L. 2001, *Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence*. Ars Pharmaceutica 42(1): 81-107
  - Garcia-Garcia E., Rosales C. 2002, *Signal Transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis*. J Leukoc Biol 72: 1092-1108
  - Geiser M., Rothen-Ruitishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz h., Semmler M., Im Hof V., Heyder J., Gehr P. 2005, *Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytotic mechanisms in lung and cultured cells*. Environ health Perspect 113: 1555-1560
  - Geys J., Coenegrachts L., Vercammen J., Engelborghs Y., Nemmar A., Nemmy B., Hoet P.H. 2006, *In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study*. Toxicol Lett. 160(3): 218-226
  - Ghio A.J., Kim C., Devlin R.B. 2000, *Concentrated Ambient Air Particles induce mild Pulmonary Inflammation in Healthy Human Volunteers*. Am J Resp Crit Care Med 162:981-988
  - Ghiran I., Barbashov S.F., Klickenstein L.B., Tas S.W., Jensenius J.C., Nicholson-Weller A. 2000, *Complement C1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectins*. Exp Med 192: 1797-1808
  - Gillooly D.J., Simonsen A., Stenmark H. 2001, *Phosphoinositides and phagocytosis*. J Cell Biol 155: 15-17
  - Goldsmith C.A., Frevert C., Imrich A., Sioutas C., Kobzik L. 1997, *Alveolar macrophage with air pollution particles*. Environ Health Perspect 105(5): 1191-1195
  - Gomberts B.D., Kramer I.M., Tatham P.E.R. 2003, *Signal Transduction*, Elsevier Academic Press, San Diego, USA; S.294-295, S. 71-101
  - Gossart S., Cambon C., Orfila C. 1996, *Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF production in rat lung inflammation induced by silica*. J Immunol 156: 1540-1548
  - Granfeld D., Dahlgren C. 2001, *An intact cytoskeleton is required for prolonged respiratory burst activity during neutrophil phagocytosis*. Inflammation 25 (3): 165-169
  - Greenberg S. 1995, *Signal Transduction of Phagocytosis*. Trend in Cell Biology 5: 93-99
  - Greenberg S., Chang P., Silverstein S.C. 1993, *Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. J exp Med 177(2): 529-534

- Greenberg S. 1999, *Modular components of Phagocytosis*. J Leukoc Biol 66: 712-717
- Greenberg S. 2001, *Diversity in Phagocytosis signaling*. Cell Science 114(6): 1039-1040
- Greenberg S., Grinstein S. 2002, *Phagocytosis and innate immunity*. Curr Opin Immunol 14: 136-145
- Gupta A.K., Gupta M. 2005, *Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles*. Biomaterials 26: 1565-1573
- Gwinn M.R., Vallayathan V. 2006, *Respiratory burst: Role in signaltransduction in alveolar macrophages*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 9(1): 27-39
- Hamilton R.H., de Villiers W.J.S., Holian A. 2000, *Class A Type II Scavenger Receptor mediates silica induced apoptosis in Chinese hamster ovary cell line*. Toxicol Appl Pharmacol 162: 100-106
- Harder S.D., Soukamp J.M., Ghoi A.J., Devlin R.B., Becker S. 2001, *Inhalation of PM<sub>2.5</sub> does not modulate Host Defense or Immune Parameters in Blood or Lung of Normal Human Subjects*. Environ health Perspect 109 (4): 599-604
- Harrison R.M., Smith D.J.T., Kibble A.J. 2004, *What is responsible for the Carcinogenicity of PM<sub>2.5</sub>?* Occup Environ Med 61: 799-805
- Hart G.A., Hesterberg T.W. 1998, *In vitro toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide*. J Occup Environ Med 40(1):29-42
- Haugen TS, Skjønberg OH, Kähler H and Lyberg T. *Production of oxidants in alveolar macrophages and blood leukocytes*. Eur Respir J 14: 1100-1105, 1999.
- Hetland G., Namork E., Schwarze P.E., Aase A. 2000, *Mechanisms for uptake of silica particles by monocytic U937 cells*. Hum Exp Toxicol 19 (7): 412-419
- Hetland R.B., Cassee F.R., Låg M., Refsnes M., Dybing E., Schwarze P.E. 2005, *Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: Heterogeneity in relation to size, city and season*. Particle and Fibre Toxicology 2: 4
- Hildemann S., Hammer C., Krombach F. 1992, *Heterogeneity of alveolar macrophages in experimental silicosis*. Environ Health Perspectives 97: 53-57
- Höhr D., Schins R.P.F., Borm P.J.A. 2002, *Uptake of native and surface-modified Quartz in epithelial cells and macrophages*. Ann Occup Hyg 46: 39-42
- Hope A.D., Swanson J.A. 2004, *Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis*. Mol Biol Cell 15: 3509-3519
- Hoppe W., Lohmann H.M., Markl H., Ziegler H. 1982, Biophysik. 2.Auflage, Springer Verlag, Berlin. S.185

- 
- Horwitz M.A. 1984, *Phagocytosis of the legionnaires disease bacterium (Legionelle pneumophila) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil*. Cell 144: 27-33
  - Hubbard A.K., Timblin C.R., Shukla A., Rincon M., Mossman B.T. 2002, *Activation of NF- $\kappa$ B-dependent gene expression by silica in lungs of luciferase reporter mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282: L968-L975
  - Hunter S., Huang M-M., Indik Z., Schreiber A.D. 1993, *FcyRIIA-mediated phagocytosis and receptor phosphorylation in cells deficient in the protein tyrosine kinase Src*. Exp Hematol 21: 1492-1497
  - Hunter S., Sato N., Kim M-K., Huang Z-Z., Chu D.H., Park J-G., Schreiber A.D. 1999, *Structural requirements of Syk for Fcy receptor-phagocytosis*. Exp Hematol 27: 875-884
  - IARC 1996, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *Carbon Black*. 65
  - IARC 1997, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *Crystalline Silica*. 68
  - IARC 2006, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *Carbon Black*. 93
  - IARC 2006, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *Titanium Dioxide*. 93
  - Iles K.E., Forman H.J. 2002, *Macrophage Signalling and respiratory Burst*. Immunol Res. 26(1-3): 95-105
  - Imrich A., Kobzik L. 1997, *Fluorescence-based measurement of nitric synthetase activity in activated rat macrophages using dichlorofluoresceine*. Nitric Oxid 1 (4): 359-369
  - Imrich A., Ning Y.Y., Kobzik L. 1999, *Intracellular oxidant production and cytokine response in lung macrophages: evaluation of fluorescent probes*. J Leukoc Biol 65 (4): 499-507
  - Innate Immunity, New Science Press Ltd, 2006, Kapitel 3
  - Institut für Arbeitsmedizin, *Quarzstaublungenerkrankungen (Silikose)*, Merkblatt zur Berufskrankheit Nr.4101 der Anlage zur Berufskrankheiten-Verordnung: Bek. Des BMA vom 3. Februar 1998-IVa 4-45206-4101/4102; Bundesarbeitsblatt 4/1998, S.61
  - Iyer R., Hamilton R.F., Li L., Holian A. 1996, *Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages*. Toxicol Appl Pharmacol 114: 84-92
  - Janeway C.A.J. 1992, *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today 13:11-16

- Janusz M.J., Austen K.F., Czop J.K. 1986, *Isolation of soluble yeast beta-glucans that inhibit human monocyte phagocytosis mediated by beta-glucans receptor*. J Immunol 137: 3270-3276
- Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Zhao Y., Guo X. 2005, *Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotubes, multi-wall nanotubes and fullerene*. Environ Sci Technol 39(5): 1378-1383
- Johansson J., Curstedt T., Robertson B. 1994, *The proteins of the surfactant system*. Eur Resp J 7(2): 372-391
- Jones B.G., Dickinson P.A., Gumbelton M., Kellaway I.W. 2002, *Lung surfactant phospholipids inhibit the uptake of respirable microspheres by alveolar macrophage NR8383*. J Pharm Pharmacol 54(8): 1065-1072
- Jones B.G., Dickinson P.A., Gumbelton M., Kellaway I.W. 2002, *The inhibition of phagocytosis of respirable microspheres by alveolar and peritoneal macrophages*. International Journal of Pharmaceutics 236: 65-79
- Kagan V.E., Tyurin V.A., Konduru N.Y., Potapovich A.I., Osipov A.N., Kisin E.R., Schwengler-Berry D., Mercer R., Castranova V., Shvedova A.A. 2006, *Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on Raw264.7 macrophages: Role of iron*. Toxicol Lett.
- Kam N. W. S., Dai H. 2005, *Carbon nanotubes as intracellular protein transportes: Generality and biological Functionality*. J Am Cem Soc 127: 6021-6026
- Kanai F., Liu H., Field S.J., Akbary H., Matsuo T., Brown G.E., Cantley L.C., Yaffe M.B. 2001, *The PX domain of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K*, Nat Cell Biol 3:675-678
- Kang J.L., Go Y.H., Hur K.C., Castranova V., 2000, *Silica-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation: involvement of reactive oxygen species and protein tyrosine kinase activation*. J Toxicol Environ Health 60: 27-46
- Kang J.L., Jung H.J., Lee K., Kim H.R., 2006, *Src Tyrosin Kinases mediate Crystalline Silica-induced NF- $\kappa$ B activation through Tyrosin Phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and p65NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 Macrophages*. Toxicol Sci 90 (2): 470-477
- Kappos A.D., Bruckmann P., Eikmann t., Englert N., Heinrich U., Hoppe P., Koch E., Krause G.H., Kreyling W.G., Rauchfuss K., Rombout P., Schulz-Klemp V., Thiel W.R., Wichmann H.E. 2004, *Health effects of particles in ambient air*. Int J Hyg Environ Health 207(4): 399-407
- Kasai H., Nishimura S. 1991, *Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance*. In oxidative stress, oxidant and antioxidants, ed Sies H., London: Academic Press 99-116

- 
- Keane M.P., Strieter R.M. 2002, *The importance of balance pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease*. *Respir Res* 3: 5
  - Kiefer F., Brumell J., Al-Alawi N., Latour S., Cheng A., Veillette A., Grinstein S., Pawson T. 1998, *The Syk Protein Tyrosin Kinase is essential for Fcγ Receptor Signaling in macrophages and neutrophils*. *Mol Cell Biol* 18 (7): 4209-4220
  - Kim J.K., Lee W.K., Lee E.J., Cho Y.J., Kim H.S., Chung Y., Kim K.A., Lim Y. 1999, *Mechanisms of silica- and titanium dioxide-induced cytotoxicity in macrophages*. *J Toxicol Environ Health A* 58(7): 437-450
  - Klickstein L.B., Barbashov S.F., Liu T., Jack R.M., Nicholson-Weller A. 1997, *Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q*. *Immunity* 7: 345-355
  - Knaapen A.M., Schins R.P.F., Steinfartz Y., Höhr D., Dunemann L., Borm P.J.A. 2000, *Ambient particulate matter induces oxidative DNA damage in lung epithelial cells*. *Inhalation Toxicology* 12 (3): 125-132
  - Knaapen A.M., Albrecht C., Becker A., Höhr D., Winzer A., Haenen G.R., Borm P.J.A., Schins R.P.F. 2002, *DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation*. *Carcinogenesis* 23(7): 1111-1120
  - Kobayashi K., Takahashi K., Nagasawa S. 1995, *The role of tyrosine phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> accumulation in Fc-gamma-receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils*. *J Biochem* 117(6): 1156-1161
  - Kobzik L., Godleski J.J., Brain J.D. 1990, *Selective down-regulation of alveolar macrophage oxidative response to opsonin-independent phagocytosis*. *J Immunol* 144: 4312-4319
  - Kobzik L., Huang S., Paulauskis J.D., Brain J.D. 1993, *Particle opsonization and Lung macrophage cytokine response*. *J Immunol* 155 (19): 367-376
  - Kobzik L., 1995, *Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors*. *J Immunol* 155 (19): 367-376
  - Kolb-Bachofen V. 1992, *Uptake of toxic silica particles by isolated rat liver macrophages (Kupffer cells) is receptor mediated and can be blocked by competition*. *J Clin Invest* 90 (5): 1819-1824
  - Krieger M. 2001, *Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems*. *J Clin Invest* 108: 793-797
  - Kuempel E.D., Attfield M.D., Vallyathan V., Lapp N.L., Hale J.M., Smith R.J., Castranova V. 2003, *Pulmonary inflammation and crystalline silica in respirable coal mine dust: dose response*. *J Biosci* 28(1): 61-69
  - Kwiatkowska K., Sobota A. 1999, *Signaling pathways in phagocytosis*. *BioEssays* 21: 422-431

- Kwiatkowska K., Sobota A. 2001, *The clustered Fcγ receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner.* Eur J Immunol 31: 989-998
- Lam C.W., James J.T.J., McCluskey R., Hunter R.L. 2003, *Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days after Intratracheal Instillation.* Toxicological Science 77: 126-134
- Langley R.J., Kalra R., Mishra N.C., Hahn F.F., Razani-Boroujerdi S., Singh S.S., Benson J.M., Pena-Philippides J.C., Barr E.B., Sopori M.L. 2004, *A Biphasic response to silica. Immunostimulation is restricted to the early stage of silicosis in Lewis rats.* Am J Resp Cell Mol Biol 30: 823-829
- Le Roy C., Wrana J., L. 2005, *Clathrin- and non clathrin-mediated endocytotic regulation of cell signaling.* Nature 6:112-126
- Lee D.J., Cox D., Li J., Greenberg S. 2000, *Rac1 and Cdc42 are required for phagocytosis, but not NF-κB-dependent Gene Expression, in macrophages challenged with pseudomonas aeruginosa.* J of Biological Biochemistry 275 (1): 141-146
- Lim Y., Kim S.H., Cho Y.J., Kim K.A., Oh M.W., Lee K.H. 1997, *Silica-induced oxygen radical generation in alveolar macrophage.* Ind Health 35 (3): 380-387
- Lohmann-Matthes M.L., Steinmüller C., Franke-Ullmann G. 1994, *Pulmonary macrophages.* Eur Respir. J. 7(9): 1678-1689
- Loike J.D., Shabtai D.Y., Neuhut R., Malitzky S., Lu E., Huseman J., Goldberg I.J., Silverstein S.C. 2004, *Statin Inhibition of Fc Receptor-Mediated Phagocytosis by Macrophages is modulated by Cell Activation and Cholesterol.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 2051-2056
- Longbardi Givan A. 2001, Flow cytometry. First Principles. Second edition. Willey-LISS New York, S.23-25; 27-29,
- Lundborg M., Johansson A., Lastbom L., Camner P. 1999, *Ingested aggregates of ultrafine carbon particles and interferon-gamma impair rat alveolar macrophage function.* Environ Res 81(4): 309-315
- Lundqvist-Gustavsson H. Gustavsson M., Dahlgren C. 2000, *Dynamic Ca<sup>2+</sup> changes in neutrophil phagosomes. A source of intracellular Ca<sup>2+</sup> during phagolysosom formation?* Cell Calcium 27(6): 353-362
- Ma J., Chen T., Mandelin J., Ceponis A., Miller N.E., Hukkanen M., Ma G.F., Kontinen Y.T. 2003, *Regulation of macrophages activation.* CMLS 60: 2334-2346

- 
- Mancino D., Buono G., Cusano M., Minucci M. 1983, *Adjuvant effects of crystalline silica on IgE and IgG1 antibody production in mice and their prevention by macrophage stabilizer poly-2-vinylpyridine N-Oxide*. Int Arch Appl Immunol 71 (3): 279-281
  - Massol P., Montecourrier P., Guillemot J.C., Chavrier P. 1998, *Fc receptor-mediated phagocytosis requires Cdc42 and Rac1*. EMBO 17 (21): 6219-6229
  - May R.C., Hall A., Machesky L.M. 2000, *Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3*. Nature Cell Biol
  - May R.C., Machesky L.M. 2001, *Phagocytosis and the actin cytoskeleton*. J Cell Science 114: 1061-1077
  - McCormack F.X., Whitsett J.A. 2002, *The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung*. The J Clinical Investigations 109(6): 707-712
  - Mills N.L., Amin N., Robinson S.D., Anand a., Davies J., Patel D., de la Fuente J.M., Cassee F.R., Boon N.A., MacNee W., Millar A.M., Donaldson K., Newby D.E. 2006, *Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans?* Am J Respir Crit Care Med 173: 426-431
  - Möller W., Nemoto I., Matsuzaki T., Hofer T., Heyder J. 2000, *Magnetic phagosome motion in J774A.1 Macrophages: Influence of cytoskeletal drugs*. Biophysical Journal 79: 720-730
  - Möller W., Hofer T., Ziesenis A., Karg E., Heyder J. 2002, *Ultrafine Particles cause cytoskeletal dysfunction in macrophages*. Toxicology and Applied Pharmacology 182: 197-207
  - Mondal K., Haskill S., Becker S. 2000, *Adhesion and Pollution Particle-induced oxidant Generation is neither necessary nor sufficient for cytokine induction in human alveolar macrophages*. Am Resp Cell Mol Biol 22: 200-208
  - Monick M.M., Powers L.S., Butler N.S., Hunninghake G.W. 2003, *Inhibition of Rho Family GTPases results in increased TNF-α production after Lipopolysaccharide exposure*. J of Immunol: 2625-2630
  - Monn C., Fendt R., Koller T. 2002, *Ambient PM(10) extracts inhibit phagocytosis of defined inert model particle by alveolar macrophages*. Inhal Toxicol 14(4): 369-385
  - Monteiro R., Van De Winkel j. 2003, *IgA Fc receptors*. Ann Rev Immunol 21: 177-204
  - Mosman T. 1983, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Methods, 65: 55-63

- Mytar B., Wolozyn M., Macura-Biengun A., Hajto B., Ruggiero I., Piekarska B., Zembala M. 2004, *Involvement of pattern recognition receptors in the induction of cytokines and reactive oxygen intermediates production by human monocytes/macrophages stimulated with tumor cells*. *Anticancer Res* 24(4): 2287-2293
- Nel A. 2005, *Air Pollution-Related Illness: Effects of Particles*. *Science* 308: 804-805
- Nel A., Xia T., Li N. 2006, Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627
- Nicod L.P. 1999, *Pulmonary defence mechanisms*. *Respiration* 66(1): 2-11
- Niedergang F., Chavalier P. 2005, *Regulation of Phagocytosis by Rho GTPases*. *CTMI* 291: 43-60
- Nikula K.J., Snipes M.B., Barr E.B., Griffith W.C., Henderson R.F., Mauderly J.L. 1995, *Comparative toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats*. *Fundam. Appl. Toxicol.* 25: 80-94
- Nkamgueu E.M., Adnet J.-J., Bernard J., Zierold K., Kilian L., Jallot E., Benhayoune H., Bonhomme P. 2000, *In vitro effects of zirconia and alumina particles on human blood monocyte-derived macrophages: X-ray microanalysis and flow cytometric studies*. *J Biomed Mater Res* 52: 587-594
- Noorman F., Barrett-Bergshoeff M.M., Biessen E.A.L., Van De Bilt E., Van Berkel T.J.C., Rijken D.C. 1997, *Cluster Mannosides can inhibit Mannose Receptor-Mediated Tissue-Type Plasminogen Activator Degradation by both Rat and Human cells*. *Hematology* 26: 1303-1310
- O'Brien D.K., Melville S.B. 2003, *Multiple effects of Clostridium perfringens binding, uptake and trafficking to lysosomes by inhibitors of macrophage phagocytosis receptors*. *Microbiology* 149: 1377-1386
- Oberdörster G. 2001 *Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles*. *Int Arch Occup Environ Health* 74: 1-8
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. 2005 *Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles*. *EHP* 113(7): 823-839
- Ofek I., Goldhar J., Keisari Y. 1996, *Nonopsonic phagocytosis of microorganisms*. *Annu Rev Microbiol* 49: 239-276
- Oghiso Y., Kubota Y. 1987, *Interleukin 1 production and accessory cell function of rat alveolar macrophages exposed to mineral dust particles*. *Microbiol Immunol* 31 (3): 275-287
- Ohtsuka Y., Brunson K.J., Jedlika A.E., Mitzner W., Clarke R.W., Zhang L.-Y., Eleff S.M., Kleeberger S.R. 2000, *Genetic Linkage analysis of susceptibility to particle exposure in mice*. *Am J Resp Cell Mol Biol* 22: 574-581

- 
- Olazabal I.M., Caron E., May R.C. 2002, *Rho-kinase and myosin-II control phagocytotic cup formation during CR, but not FcγR phagocytosis*. *Curr Biol* 12: 1413-1418
  - Ostro B.D., Hurley S., Lipsett M.J. 1999, *Air pollution and daily motility in the Coachella Valley, California: a study of PM10 dominated by coarse particles*. *Environ Res* 81: 231-238
  - Oud Albas van B., Mattie A.M., Furth van R. 1983, *A quantitative evaluation of pulmonary macrophage kinetics*. *Cell Tissue Kinet.* 16: 211
  - Palecanda A., Kobzik L. 2000, *Alveolar Macrophage-Environmental Particle Interaction: Analysis by Flow Cytometry*. *Methods* 21: 241-247
  - Palecanda A., Kobzik L. 2001, *Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptor*. *Curr Mol Med* 1(5): 589-595
  - Palmbos P.L., Sytsma M.J., DeHeer D.H., Bonnema J.D. 2002, *Macrophage exposure to particulate titanium induces phosphorylation of the protein tyrosine kinase lyn and the phospholipase Cγ-1 and Cγ-2*. *J Orthop Res* 20 (3): 483-489
  - Park J.B. 2003, *Phagocytosis induces superoxid formation and apoptosis in macrophages*. *Exp Mol Med* 35(5): 325-335
  - Parod R.J., Brain J.D. 1983, *Uptake of Latex particles by macrophages: characterization using flow cytometry*. *Am J Physiol* 245(3):CC220-226
  - Parod R.J., Brain J.D. 1986, *Immune opsonin-independent phagocytosis by pulmonary macrophages*. *J of Immunol* 136(6):2041-2047
  - Patel J.C., Hall A., Caron E. 2002, *Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during FcγR-mediated phagocytosis*. *Mol Cell Biol* 13: 1215-1226
  - Patil S., Bunderson M., Wilham J., Black S.M. 2004, *Important role of Rac1 in regulating reactive oxygen species generating and pulmonary arterial smooth muscle cell growth*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1314-1322
  - Pearson A.M. 1996, *Scavenger receptors in innate immunity*. *Curr Opin Immunol* 8:20-28
  - Perkins R.C., Scheule R.K., Holian A. 1991, *In vitro bioactivity of asbestos for the human alveolar macrophage and its modification by IgG*. *Am Resp Cell Mol Biol* 4(6): 532-537
  - Pernis B. 2005, *Silica and the immune system*. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 76(2): 38-44
  - Piguet P.F., Collart M.A., Grau G.E., Sappino A.P., Vassalli P. 1990, *Requirements of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis*. *Nature* 344(6263): 245-247

- Pison U., Max M., Neuendank A., Weissbach S., Pietschmann S. 1994, *Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for ,non-surfactant' functions of the surface system.* Eur Clin Invest 24 (9): 586-599
- Platt N., Suzuki H., Kurihara Y., Kodama T., Gordon S. 1996, *Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro.* Proc Natl Acad Sci 93: 12456-12460
- Platt N., Gordon S. 2001, *Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional?-The mouse tail.* J clin Investigations 108(5): 649-654
- Pope C.A. III, Burnett R.T., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Ito K., Thurston G.D. 2002, *Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution.* J Am Med Assoc 287: 1132-1147
- Porter D.W., Barger M., Robinson V.A., Leonard S.S., Landsittel D., Castranova V. 2002, *Comparative of low doses of aged and freshly fractured silica on pulmonary inflammation and damage in the rat.* Toxicology 175(1-3): 63-71
- Porter D.W., Hubbs A.F., Mercer R., Robinson V.A., Ramsey D., McLaurin J., Khan A., Battelli L., Brumbaugh K., Teass A., Castranova V. 2004, *Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation.* Toxicol Science 79: 370-380
- Porter D.W., Millecchia L.L., Willard P., Robinson V.A., McLaurin J., Khan A., Brumbaugh K., Beighley C.M., Teass A., Castranova V. 2006, *Nitric oxide and reactive oxygen species production cause progressive damage in rats and after cessation of silica inhalation.* Toxicol Science 90 (1): 188-197
- Prokhorova S., Lavnikova N., Laskin D.L. 1994, *Functional characterization of interstitial macrophage subpopulations of alveolar macrophages from rat lung.* J Leukoc Biol 55 (2): 141-146
- Puleda S., Paoletti L., Ferdinandi M. 1999, *Airborne quartz concentration in an urban site.* Environ Pollut 104: 441-448
- Qian Y., Liu K.J., Chen Y., Flynn D.C., Castranova V., Shi X. 2005, *Cdc42 regulates arsenic-induced NADPH Oxidase Activation and Cell Migration through Actin Filament reorganization.* J Biol Chem 280 (5): 3875-3884
- Rabinivitch M. 1995, *Professional and non-professional phagocytes: an introduction.* Trends Cell Biol 5: 85-87
- Rae T. 1975, *A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages in vitro.* J Bone Joint Surg Br 57(4): 444-450
- Rao K.M.K., Porter D., Meighan T., Castranova V. 2004, *The source of inflammatory mediators in the lung after silica exposure.* EHP 112(17): 1679-1685
- Ravetch J.V., Bolland S. 2001, *IgG Fc receptors.* Annu Rev Immunol 19: 275-290

- 
- Ren Y., Silverstein R.L., Allen J., Savill J. 1995, *CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis*. J Exp Med 181: 1857-1862
  - Renwick L.C., Brown D., Clouter A., Donaldson K. 2004, *Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types*. Occup Environ Med 61(5): 442-447
  - Renwick L.C., Donaldson K., Clouter A. 2001, *Impairment of Alveolar Macrophage Phagocytosis by Ultrafine Particles*. Toxicol Appl Pharmacol 172: 119-127
  - Ribbin J.B. 2003, *Alveolar macrophages. Wielding the double-edged sword of inflammation*. Am J Resp and Crit Care Med 167: 103-104
  - Richards R.J., Davies N., Atkins L., Oreffo V.I. 1987, *Isolation biochemical characterization, and culture of lung type II cells of the rat*. Lung 165: 143-158
  - Rimal B., Greenberg A.K., Rom W.N. 2005, *Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding*. Curr Opinion in Pul Med 11(1): 169-173
  - Rojanasakul Y., Ye J., Chen F., Wang L., Cheng N., Castranova V., Vallayathan V., Shi X., 1999, *Dependence of NF- $\kappa$ B activation and radical generation on silica induced TNF- $\alpha$  production in macrophages*. Mol Cell Biochem. 200: 119-125
  - Rosales C. 2005, *Molecular mechanisms of Phagocytosis*, Landes Bioscience, Eureka, Georgetown, Texas, USA
  - Rosengart M.R., Arabi S., Bauer G., Garcia I., Jelacic S., Maier R.V. 2002, *The Actin cytoskeleton: An essential component for enhanced TNF- $\alpha$  production by adherent monocytes*. SHOCK 17 (2): 109-113
  - Ross M.P., Nolan R.P., Langer A.M., Cooper W.C. 1993, *Health effects of mineral dusts other than asbestos*. Aus: Health effects of mineral dust. Guthrie G.D., Mossman B.T., Washington DC, Reviews in Mineralogy, Mineralogical Society of America: 361-409
  - Rubins J.B. 2003, *Alveolar macrophages: wielding the double-edge sword of inflammation*. Am respire Crit Care Med 167(2): 171-179
  - Sagai M., Lim H., Ichinose T. 2000, *Lung carcinogenesis by diesel exhaust particles and the carcinogenic mechanism via active oxygens*. Inhalation Toxicology 12(3):215-223
  - Sarfstein R., Gorzalczany Y., Mizrahi A., Berdichevsky Y., Molshanski-Mor S., Weinbaum C., Hirshberg M., Dagher M-C., Pick E. 2004, *Dual role of Rac in the Assembly of by NADPH Oxidase, Tethering to the membrane and activation of p67<sup>phox</sup>*. J Biol Chem 279 (16): 16007-16016
  - Sautès-Fridman C., Cassard L., Cohen-Solal J., Fridman W.H. 2003, *Fc gamma Receptors: A magic link with the outside world*. ASHI Quaterly 4: 148-151

- Savill J., Dransfield I., Hogg N., Haslett C. 1990, *Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis*. Nature 343 (11): 170-172
- Schins R.P., Duffin R., Höhr D., Knappen A.M., Shi T., Weishaupt C., Stone V., Donaldson K., Borm P.J.A. 2002, *Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells*. Chem Res Toxicol 15(9): 1166-1173
- Schins R.P., Lightbody J.H., Borm P.J., Shi T., Donaldson K., Stone V. 2004, *Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents*. Toxicol Appl Pharmacol 195(1): 1-11
- Schliwa M. 1982, *Action of Cytochalasin D on Cytoskeletal Networks*. J of Cell Biol 92: 79-91
- Schwartz J. 1994, *Air pollution and hospital admission for the elderly in Detroit, Michigan*. Am J Resp Crit Care Med 150(3): 648-655
- Schwartz J., Dockery D.W., Neas L.M. 1996, *Is daily mortality associated specifically with fine particles?* J Air Waste Manag 46: 927-939
- Serrander L., Larsson J., Lundquist H., Lindmark M., Fallman M., Dahgren C., Stendahl O. 1999, *Particles binding to b2-integrins mediate intracellular production of oxidative metabolites in human neutrophils independent of phagocytosis*. Biochim Biophys Acta 1452:133-144
- Shapiro H.M. 2003, *Practical Flow Cytometry*. Willey-LISS New York, 4<sup>th</sup> Edition, S. 159, 167
- Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R., Murray A.R., Johnson V.J., Potapovich A.I., Tyurina Y.Y., Gorelik O., Arepalli S., Schwegler-Berry D., Hubbs A.F., Antonini J., Evans D.E., Ku B.-K., Ramsey D., Maynard A., Kagan V.E., Castranova V., Baron P. 2005, *Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary response to single walled carbon nanotubes in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol
- Siegel P.D., Saxena R.K., Saxena Q.B., Ma J.K., Yin X.J., Castranova V., Al-Humadi N., Lewis D.M. 2004, *Effects of diesel exhaust particles (DEP) on immune response: contribution of particulate versus organic soluble components*. J Toxicol Environ Health 67(3): 221-231
- Silverstein S.C. 1995, *Phagocytosis of microbes: insights prospects*. Trends in Cell Biology 5: 141-142
- Song X., Tanaka S., Cox D., Lee S.C. 2004, *Fcy receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI-3K and Ras/ERK MAPK pathways in phagocytosis and chemokine production*. J Leukoc Biol 75: 1147-1155
- Stahl P.D., Ezekowitz R.A.B. 1998, *The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense*. Curr Opin in Immunol 10: 50-55

- 
- Stuart L.M., Ezekowitz R.A.B. 2005, *Phagocytosis: Elegant complexity*. Immunity 22: 539-550
  - Stringer B., Imrich A., Kobzik L. 1995, *Flow cytometric assay of lung macrophage uptake of environmental particulates*. Cytometry 20(1): 23-32
  - Stringer B., Imrich A., Kobzik L. 1996, *Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: Quantitation of Particle-Specific Binding and IL-8 Production*. Exp Lung Research 22: 494-508
  - Stringer B., Kobzik L. 1996, *Alveolar macrophage uptake of the environmental particulate titanium dioxide: role of surfactant components*. Am Resp Cell Mol Biol 14(2): 155-160
  - Stringer B., Kobzik L. 1998, *Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidative stress*. J Toxicol Environ Health A 55 (1): 31-44
  - Stroeger T., Reinhard C., Takenaka S., Schroepel A., Krag E., Ritter B., Heyder J., Schulz H. 2006, *Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice*. Environ Health Perspect 114 (3): 328-333
  - Strzelecka A., Kwiatkowska K., Sobota A. 1997, *Tyrosin phosphorylation and Fcy receptor mediated phagocytosis*. FEBS Lett 400: 11-14
  - Strzelecka A., Kwiatkowska K., Sobota A. 2002, *Lyn and Syk Kinases are sequential engaged in phagocytosis mediated by Fcy receptor*. Journal of Immunology 169: 6787-6794
  - Sumimoto H., Ueno N., Yamasaki T., Taura M., Takeya R. 2004, *Molecular Mechanisms Underlying Activation of Superoxide-Producing NADPH Oxidase: Roles for their regulatory proteins*. Jpn J Infect Dis 57: S24-S25
  - Sung S.S., Nelson R.S., Silverstein S.C. 1983, *Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages*. J Cell Biol 96: 160-166
  - Suzuki T., Kono H., Hirose N., Okada M., Yamamoto T., Yamamoto K., Honda Z. 2000, *Differential involvement of Src family kinases in Fcy receptor-mediated phagocytosis*. J Immunol 165: 473-482
  - Swanson J.A., Hoppe A.D. 2004, *The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis*. J Leukoc Biol 76: 1-11
  - Sánchez-Mejorada G., Rosales C. 1998, *Signal Transduction by immunoglobulin Fc receptors*. J Leukoc Biol 63: 521-533
  - Tak P.P., Firestein G.S. 2001, *NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory disease*. Journal of Clinical Investigation 107(1): 7-11

- Takizawa f., Tsuji S., Nagasawa S. 1996, *Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells*. FEBS Lett 397: 269-272
- 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 Mol Physiol 287: L1127-L11333
- Tao F., Gonzalez-Flecha B., Kobzik L. 2003, *Serial Review: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) in lung injury and disease*. Free Radical Biology & Medicine 35(4): 327-340
- Taylor N., Jahn T., Smith S., Lamkin T., Uribe L., Liu Y., Durden D.L., Weinberg K. 1997, *Differential Activation of the Tyrosin Kinases ZAP-70 and Syk after FcγRI stimulation*. Blood 89 (2): 388-396
- Tenner A.J., Robinson S.L., Borchelt J., Wright J.R. 1989, *Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis*. J Biol Chem 264 (23): 13923-13928
- Thibodeau M., Giardina C., Hubbard A.K. 2003, *Silica-induced caspase activation in mouse alveolar macrophages is dependent upon mitochondrial integrity and aspartic proteolysis*. Toxicological Science 76: 91-101
- Thomas C.A., Li Y., Kodama T., Suzuki H., Silverstein S.C., El Khoury J. 2000, *Protection from lethal Gram-positive Infections by Macrophage Scavenger Receptor-dependent Phagocytosis*. J Exp Med 191(1): 147-155
- Tjelle T.E., Lovdal T., Berg T. 2000, *Phagosom dynamics and function*. Bio Essays 22: 255-263
- Trasande L., Thurston G.D. 2005, *The role of air pollution in asthma and other pediatric morbidities*. J Allergy Clin Immunol 115(4): 689-699
- Underhill D.M., Ozinsky A. 2002, *Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action*. Annu Rev Immunol 20: 825-852
- Underhill D.M., Rosnagle E., Lowell C.A., Simmons R.M. 2005, *Dectin-1 activates Syk tyrosin kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production*. Blood 106: 2543-2550
- Vallyathan V., Shi X.L., Dalal N.S., Irr W., Castranova V. 1988, *Generation of free radicals from fresh fractured silica dust. Potential role in acute silica induced lung injury*. Am Rev Resp Dis 138(5): 1213-1219
- Verhoef J. 1991, *Host-Pathogen Relationship in Respiratory Tract Infections*. Clinical Therapeutics 13(1): 172-180

- 
- Vieira O.V., Botelho R.J., Rameh L., Brachmann S.M., Matsuo t., Davidson H.W., Schreiber A., Backer J.M. Cantley L.C., Grinstein S. 2001, *Distinct roles of class I and III phosphatidylinositol 3-kinase in phagosome formation and maturation*. J Cell Biol 154: 631-644
  - Virgillio Di F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J.M., Morelli A., Torboli M., Bolognesi G., Baricordi O.R. 2001, *Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells*. Blood 97 (3): 587-600
  - Wahrheit D.B., Hansen J.F., Yuen I.S., Kelly D.P., Snajdr S.I., Hartsky M.A. 1997, *Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation*. Toxicol Appl Pharmacol 145 (1): 10-22
  - Wahrheit D.B., Laurence B.R., Reed K.L., Roach D.H., Reynolds G.A.M., Webb T.R. 2004, *Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats*. Toxicological Science 77: 117-125
  - Wahrheit D.B., Brock W.J., Lee K.P., Webb T.R., Reed K.L. 2005, *Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO<sub>2</sub> particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity*. Toxicol Sci 88 (2): 514-524
  - Warshawsky D., Reilman R. Cheu J., Radike M., Rice C. 1994, *Influence of particle dose on the cytotoxicity of hamster and rat pulmonary alveolar macrophages in vitro*. J Toxicol Environ Health 42(4):407-421
  - Wichmann H.E., Spix C., Tuch T., Wolke G., Peters A., Heinrich J., Kreyling W.G., Heyder J. 2000, *Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass*. Res Rep. Health Eff. Inst. 5-86, discussion 87-94
  - Wilhelm C., Billotey C., Roger J., Pons J.N. Bacri J.-C., Gazeau F. 2003, *Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating*. Biomaterials 24 (6): 1001-1011
  - Wojciak-Stothard B., Entwistle A., Garg R., Ridley A.J. 1998, *Regulation of TNF- $\alpha$ -induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac and Cdc42 in human endothelial cells*. J Cell Physiol 176 (1): 150-165
  - Xiao G.G., Wang M., Li N., Loo J.A., Nel A.E. 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 (50): 50781-50790
  - Xu H., Hoet P.H., Nemry B. 2002, *In vitro toxicity assessment of polyvinyl chloride particles and comparison of six cellular systems*. J Toxicol Environ Health A 65(16): 1141-1159

- Yagi S., Suzuki S., Hasegawa A., Okumura K., Ra C. 1994, *Cloning of the cDNA for the deleted syk kinase homologous to Zap70 from human basophilic leukemia cell line (KU812)*. *Biochem Biophys Res Commun* 200:28
- Yamamori T., Inanami O., Nagahata H., Kuwabara M. 2004, *Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47 (phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt*. *Biochem Biophys Res Commun* 316 (3): 720-730
- Zalavary S., Grenegard M., Stendahl O., Bengtsson T. 1996, *Platelets enhance Fc(gamma) receptor mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization*. *J Leukoc Biol* 60 (1): 58-68
- Zanobetti A., Schwartz J., Dockery D.W. 2000, *Airborne Particles are a risk factor for hospital admission for heart and lung disease*. *EHP* 108(11): 1071-1077
- Zetterberg G., Johansson A., Lundahl J., Lundborg M., Sköld C.M., Tornling G., Camner P., Eklund A. 1998, *Differences between rat alveolar and interstitial macrophages 5 wk after quartz exposure*. *Am Physiological Society*: L226-L234
- Zhang Z., Shen H.M., Zhang Q.F., Zong C.N. 2000, *Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages*. *Environ Res* 82(3): 245-252
- Zhang J., Zhu J., Imrich A., Cushion M., Kinane T.B., Koziel H. 2004, *Pneumocystis activates human alveolar macrophages NF-κB Signaling through Mannose Receptors*. *Infection and Immunity* 3147-3160
- Zhang J., Zhu J., Bu X., Cushion M., Kinane T.B., Avraham H., Koziel H. 2005, *Cdc42 and RhoB activation are required for Mannose Receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages*. *Mol Biol Cell* 16: 824-834

---

## Kurzfassung

Die gesundheitsschädlichen Risiken, die von der Feinstaubbelastung ausgehen, sind allgemein anerkannt und nach in Kraft treten der EU-Regelung zur Feinstaubbelastung auch in das öffentliche Interesse gelangt. Die Exposition gegenüber respirablen Partikeln wird mit Krankheitsbildern wie Asthma, COPD (engl.: Chronic Obstructive Pulmonary Disease), Fibrose und Krebs in Verbindung gebracht, und hierbei wird die Rolle der chronischen Entzündung diskutiert.

Ziel dieser Studie war es, die Mechanismen und Konsequenzen der Partikelaufnahme durch alveolare Makrophagen, die mit der Induktion einer chronischen Entzündung einhergeht, zu untersuchen. Alveolare Makrophagen bilden die erste Verteidigungslinie gegen inhalede Pathogene und sind sowohl für die Clearance als auch für die Induktion der inflammatorischen Antwort verantwortlich. Daher sind sie für die Untersuchung partikel-induzierter Erkrankungen von besonderem Interesse. Verschiedene Modellpartikel, wie DQ12 (Dörentrapper Quarz,  $\text{\O} 0,96\mu\text{m}$ ), feinem ( $\text{\O} 0,26\mu\text{m}$ ) und ultrafeinem ( $\text{\O} 0,025\mu\text{m}$ ) Titandioxid, feinem ( $\text{\O} 0,26\mu\text{m}$ ) und ultrafeinem ( $\text{\O} 0,014\mu\text{m}$ ) Carbon Black sowie Single Walled Carbon Nanotubes (Länge  $1\mu\text{m}$ ,  $\text{\O} 0,001\mu\text{m}$ ), die sowohl umweltmedizinische als auch nanotechnologische Relevanz aufweisen, wurden für die mechanistischen Untersuchungen eingesetzt. Dabei stellte sich der Aufnahmeprozess als klassische Phagozytose unter Beteiligung des Aktinzytoskeletts dar. Die klassischen Phagozytose-Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich des Aufnahmemechanismus sowie der inflammatorischen Antwort. Untersuchungen an der Makrophagenzelllinie NR8383 unter Verwendung von DQ12 wiesen hierbei auf die entscheidende Rolle des Fc $\gamma$ RII hin. Dabei löst die DQ12-Phagozytose über diesen Rezeptor eine Signalkaskade unter der Aktivierung der Kinasen Lyn, Syk und PI3K sowie der GTPasen Cdc42 und Rac, ohne Aktivierung von Rho, aus. Bei der Entwicklung der durch die Exposition gegenüber Quarz induzierten Entzündung, gelten die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Freisetzung von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als Schlüsselereignisse. Die Untersuchungen zur Freisetzung dieser inflammatorischen Mediatoren ergaben deren Abhängigkeit von der Partikelaufnahme selbst und/oder der Funktionalität der Aktin-Zellskelettkomponente. Parallele Untersuchungen zeigten bei Bindung des spezifischen Fc $\gamma$ RII-Liganden eine zur DQ12 Induktion vergleichbare inflammatorische Antwort.

Resultierend aus diesen Ergebnissen könnten sich Möglichkeiten zur Prävention Partikel-induzierter Erkrankungen einerseits und ein Einsatz von Partikeln in Diagnose und Therapie andererseits ergeben.

---

**Lebenslauf**

**Familienname:** Haberzettl  
**geborene:** Mellen  
**Vorname:** Petra  
**Geburtsdatum:** 03.05.1971  
**Geburtsort:** Krefeld ehemals Hüls / Nord-Rhein-Westfalen  
**Nationalität:** Deutsch  
**Privatadresse:** Merkurstrasse 42  
40223 Düsseldorf  
**Familienstand:** verheiratet, seit: 08.07.1994

**Ausbildung:**

**1977 – 81:** Gemeinschaftsgrundschule St. Tönis  
**1981 – 87:** Gemeinschaftshauptschule Kirchenfeld  
Abschluss: Allgemeine Oberschulreife  
**1987 – 91:** Richarda-Huch-Gymnasium / Gymnasium Horkesgath / Krefeld  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
**1991 – 92:** Ruhr-Universität Bochum, Studium der Chemie (1 Semester)  
**1992 – 94:** Rheinische Akademie, Köln  
Berufsausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin  
**1994 – 2003:** Ruhr-Universität Bochum, Studium der Biochemie  
**2003:** Diplom in Biochemie, Abschlussnote: 2 (gut)  
Diplomarbeit am Biochemischen Institut der Ruhr-Universität Bochum,  
Abteilung für Molekulare Neurobiochemie,  
Arbeitsgruppe: Neurotrophin Forschung  
Thema der Diplomarbeit:  
*“Funktion der Juxtamembran-Region des p75<sup>LNTR</sup>”*  
Betreuer: Prof. Dr. R. Heumann and PD Dr. A. Blöchl  
**seit 2003:** Doktorand am Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF)  
Düsseldorf, Abteilung für Partikel Forschung als Stipendiat des DFG  
Internationalen Graduierten Kollegs “Molecular Mechanisms of Food  
Toxicology”  
Titel der Doktorarbeit:  
*“Mechanismen und Konsequenzen der Partikelaufnahme in alveolaren  
Makrophagen. Rolle des Aktinzytoskeletts und des Fcy-Rezeptors-II ”*

**Zusatzqualifikationen während der Promotion:**

**Postdoctoral Kurse in Toxikologie:**

- Occupational Toxicology
- Epidemiology
- Toxicological Risk Assessment
- Medical and Forensic Toxicology
- Molecular Toxicology
- Cellular Toxicology

**andere besuchte Kurse:**

- Kurs in Durchflusszytometrie
- Kurs in Labortierhaltung

## Veröffentlichungen

### Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

*The crucial role of particle surface reactivity in respirable quartz-induced reactive oxygen/nitrogen species formation and APE/Ref-1 induction in rat lung.* Albrecht C., Knaapen A.M., Becker A., Höhr D., Haberzettl P., van Schooten F.J., Borm P.J., Schins R.P.; Respir Res. 2005 6:129.

*The role of Particle-surface and Particle-Macrophage-Interactions in Quartz-induced Inflammation and Lung Clearance.* Catrin Albrecht, Doris Höhr, Petra Haberzettl, Andrea Becker, Paul J.A. Borm, Roel P.F. Schins, eingereicht

*Inhibition of the mitochondrial respiratory chain function abrogates quartz induced DNA damage in lung epithelial cells.* Hui Li, Petra Haberzettl, Catrin Albrecht, Doris Höhr, Ad M. Knappen, Paul J.A. Borm, Roel Schins, eingereicht

*Crucial role of actin in the uptake and biological response to respirable quartz particles in macrophages.* Petra Haberzettl, Rodger Duffin, Ursula Krämer, Doris Höhr, Roel P. F. Schins, Paul J.A. Borm, Catrin Albrecht, eingereicht

*Respirable quartz particles induce FcγII-Receptor signaling in rat alveolar macrophages.* Petra Haberzettl, Roel P. F. Schins, Paul J.A. Borm, Catrin Albrecht, in Präparation

### Aus dieser Arbeit hervorgegangene Auszeichnungen:

Winner of the new investigator award; North Carolina 2005; Conference: "Mechanisms of Action of Inhaled Fibers, Particles, and Nanoparticles in Lung and Cardiovascular Diseases"

### Aus dieser Arbeit hervorgegangene Konferenzbeiträge:

*Dose and time dependent quartz uptake of alveolar macrophages.* P. Haberzettl, D. Höhr, P. J. A. Borm, C. Albrecht, 2004: Naunin-Schmiedeberg's Archives of pharmacology, 369(1), R113, 451, Mainz 09-11.03.2003

*The study of dose and time dependent quartz uptake by alveolar macrophages.* P. Haberzettl, R. P. F. Schins, P. J. A. Borm, C. Albrecht, 1st Symposium Molecular Research in Environmental Medicine, Düsseldorf 18-20 March 2004.

*Importance of surface properties of quartz particles for cellular uptake and lung clearance.* C. Albrecht, D. Höhr, R. Schins, A. Becker, P. Haberzettl, E. Jermann, P. Borm, ATS San Diego 2004

*Different receptors mediate the uptake of quartz particles in alveolar macrophages.* P. Haberzettl, R. P. F. Schins, R. Duffin, P. J. A. Borm, C. Albrecht, 2004: Signal transduction volume 4(3-4):89 - 97, STS meeting, Weimar

*Uptake of quartz particles in rat alveolar macrophages is mediated by Fc $\gamma$ II-receptor via the actin cytoskeleton.* P. Haberzettl, R. P.F. Schins, R. Duffin, P. J. A. Borm, C. Albrecht, ATS San Diego, 2005

*Phagocytosis of particles by alveolar macrophages: possible mechanisms and cellular consequences.* Invited talk at the RICE-University Houston CBEN/CNST (Center for environmental Nanotechnology and Center for Nanoscale Science and Technology), 2005

*Fc $\gamma$ -Receptor triggered signaling induced by uptake of quartz particles in rat alveolar macrophages.* Conference: "Mechanisms of Action of Inhaled Fibers, Particles, and Nanoparticles in Lung and Cardiovascular Diseases" 2005, North Carolina

*Respirable quartz particles induce Fc $\gamma$ II-receptor signaling in rat alveolar macrophages.* P. Haberzettl, R. P. F. Schins, P. J. A. Borm, C. Albrecht, 2005 STS Meeting, Weimar

*Crucial role of Fc $\gamma$ II-receptor in quartz-induced inflammatory responses.* P. Haberzettl, R.P.F. Schins, P.J.A. Borm and C. Albrecht, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 372(1), R119, 455, Mainz 4.-6. April 2006

*Quartz-activated macrophages trigger nuclear factor kappa-B pathway activation in lung epithelial cells.* D. van Berlo, P. Haberzettl, C. Albrecht and R.P.F. Schins Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 372(1), 454, R118, 455, Mainz 4.-6. April 2006

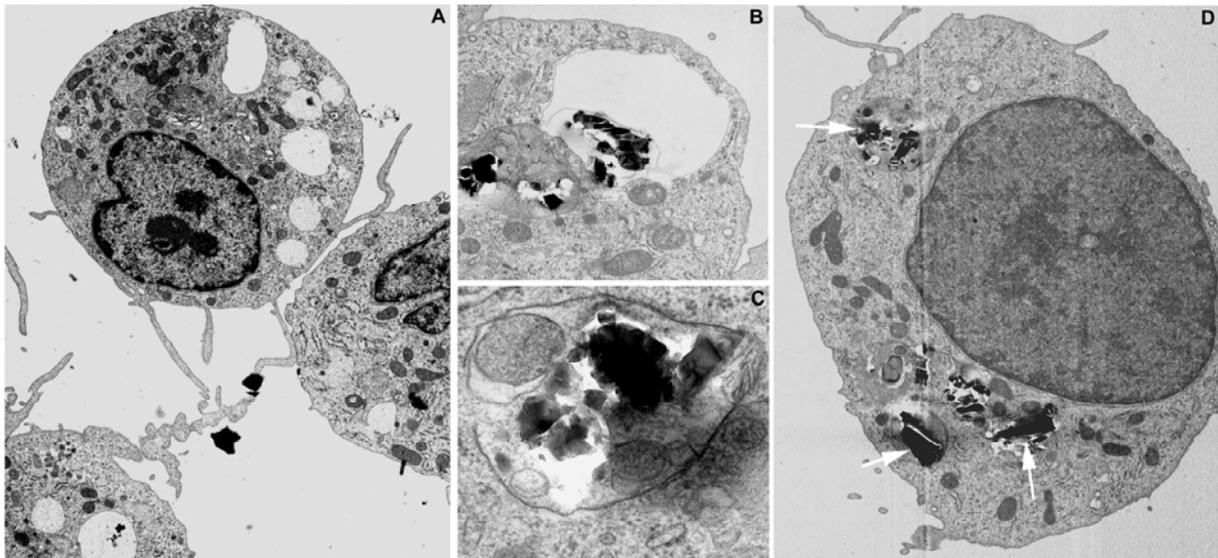
*The role of particle-macrophages-interactions in inflammation and lung clearance.* C. Albrecht, P. Haberzettl, D. Höhr, A. Knaapen, A. Becker, P. Borm, R. Schins INIS Meeting in Hanover, 31.05.-03.06.2006

*Mechanisms of alveolar macrophage activation by respirable quartz particles.* Petra Haberzettl, Roel P.F. Schins, Rodger Duffin, Paul J.A. Borm, Catrin Albrecht, MREM-Meeting, Paris, 30.08.-02.09.2006

## Zur Geschichte der Entdeckung der Phagozytose

Das Phänomen der Phagozytose, welches in meiner Doktorarbeit eingehend untersucht wurde, hat bereits eine lange Geschichte.

Elie Metchnikoff (1845-1916) gilt im Allgemeinen als der Entdecker der Phagozytose, und seine Untersuchungen diesbezüglich führten zum Konzept der zellularen Immunität.



**Elektronenmikroskopische Untersuchung der Morphologie der DQ12-Phagozytose. Die einzelnen Schritte der Partikel-Aufnahme durch die Makrophagenzelllinie NR8383 sind in den verschiedenen Abbildungen wie folgt zu beobachten:**

- (A) Ausbildung von Pseudopodien durch die Makrophagen zu den DQ12-Partikeln.
- (B) Umfließen des, und Membranschluss hinter dem aufzunehmenden Partikel.
- (C) Aufgenommener, von einer Membran umgebener (Phagosom) Partikel.
- (D) Makrophage mit aufgenommenen DQ12-Partikeln (weiße Pfeile).

(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Doris Höhr).

Doch war Metchnikoff nicht der erste, der das Phänomen der zellulären Partikel Aufnahme beschrieben hat. Aus der Zeit vor ihm liegen zahlreiche Publikationen vor, in denen eine solche bereits aufgezeichnet wurde. So existiert bereits ein Präparat von 1876, welches von dem Kanadier William Osler hergestellt wurde, dass die Aufnahme von Kohlenstaubpartikeln durch humane alveolare Zellen zeigt. Ebenso haben Slavjansky (1869) und Rupperts (1878) die Aufnahme von Kohlenstaub (Kohlenstaubin) und Jns (1876) die von Silikat-Staub (Kiesselstaubin) beschrieben (C.T. Ambrose 2006, „*The Osler slide, a demonstration of Phagocytosis from 1876. Reports of Phagocytosis before Metchnikoff's 1880 paper.*“ Cellular Immunology 240: 1-4).

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei meinen Betreuern, Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich sowie Herrn Prof. Dr. P. Borm für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung während meiner Doktorarbeit und die Begutachtung derselben bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich an Frau Dr. C. Albrecht richten, die immer zu allen Diskussion bereit, während meiner Doktorarbeit stets helfend neben mir gestanden hat und die mir über die Zeit über die Wissenschaft hinaus eine Hilfe war. Catrin, die schönen, wenn auch anstrengenden, Tage in Florenz und North Carolina und die vielen Kaffeepausen-Diskussionen, die nicht immer wissenschaftlicher Natur waren, werden mir immer in Erinnerung bleiben. Da wären noch so viele weitere Punkte, deren Aufzählung hier einfach den Rahmen sprengen würde. Deshalb sage ich einfach nur: Danke für alles, Catrin.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. R. Schins, der immer gutgelaunt mit einer Politik der offenen Tür für jedes Gespräch, besonders wenn es um Fragen der ESR-Spektroskopie ging, zur Verfügung stand. Auch seine Hilfe bei Vortragsvorbereitungen habe ich sehr zu schätzen gelernt. Danke Roel, dass Du mich vor den „Dampfzellen“ gerettet hast.

Einen Dank für die helfenden Hände im Labor möchte ich an die technischen Assistentinnen Frau Winzer, Frau Weishaupt und Frau Ledermann richten. Danke Kirstin, für die unzähligen Pipettenspitzen die Du mir gesteckt hast und die literweise Transfer-Puffer an deren Ansatz Du beteiligt warst.

Des weitern möchte ich mich bei allen meinen Mitstreitern in Sachen Doktorarbeit für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken. Dabei gilt ein besonderer Dank Ulrich Sydlik und Inka Galitz. Danke Uli, dass Du, bei zu hohem Frustpegel stets mit einem rettenden Kaffee und einem aufheiternden Gespräch bereit standest. Danke Inka, für die in diesen Situationen dringend nötigen Frischluftpausen.

Ein weiterer Dank gilt meinen Partnern an der RICE-Universität (Houston, TX, USA). Bei Tonya Leeuw möchte ich mich besonders für die von Ihr durchgeführten NIR-Messungen zur Bestimmung der SWNT-Aufnahme bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. B. Weisman und Herrn Dr. P. Cherukuri richten, die mir neben der guten Zusammenarbeit auch einen wissenschaftlich sehr interessanten Gastaufenthalt an der RICE-Universität bereitet haben.

Herrn E. Bünemann aus der Abteilung für Dermatologie der Universitätsklinik Düsseldorf möchte ich danken für seine Mitarbeit an der Aufnahme der zeitaufgelösten Mikroskopie. Frau Dr. D. Höhr möchte ich für die Bereitstellung der EM-Aufnahmen danken.

Ferner möchte ich dem DFG Internationalen Graduiertenkolleg „*Molecular mechanisms of food toxicology*“ (IGK738) für die Unterstützung dieser Arbeit durch mein Stipendium danken.

## Danksagung

---

Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. R. Kahl sowie allen GK-Mitgliedern für die interessanten toxikologischen Treffen und Kurse.

Eltern, Schwiegereltern, Oma, Bruder, Schwägerin und natürlich Patenkind möchte ich Danken, dass sie es 3 Jahre ohne mich ausgehalten haben.

Abschließend gilt ein ganz besonderer Dank meinem Ehemann Lutz Haberzettl, der auf vieles, besonders auf meine Anwesenheit verzichten musste und dafür allen Ärger und Frust abbekommen hat. Danke Lutz, dass Du als Wächter und Prellbock an der vordersten Front der Feindabwehr gestanden hast. Ich danke Dir auch für die vielen wissenschaftlich sehr anregenden Gespräche, die vor allem am Sonntagmorgen beim Frühstück oder spät in der Nacht stattgefunden haben.