

**Molekulare Signalereignisse der Nanopartikel-
Zell-Interaktion als toxikologische Parameter
für moderne Nanomaterialien**

Inaugural – Dissertation

zur

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

Vorgelegt von

Christiane Bieschke

aus Düsseldorf

Düsseldorf, August 2015

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

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Referent: PD Dr. Klaus Unfried
Koreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt
Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2015

„Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben. Der sicherste
Weg zum Erfolg ist immer, es noch einmal zu
versuchen.“

(Thomas Alva Edison)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1. Toxikologische Relevanz von Nanopartikeln	1
1.2. Zielorgane von NP	3
1.3. Zusammensetzung von NP	6
1.3.1. Kohlenstoff-haltige NP	6
1.3.2. Metall-haltige NP	9
1.4. Einfluss der Protein-Corona auf die Eigenschaften von Nanomaterialien	13
1.5. Zelluläre Aufnahme von NP	15
1.5.1. Endozytose	15
1.5.2. Passiver Membrantransport	18
1.6. Toxikologisch relevante Endpunkte, ausgelöst durch NP	19
1.6.1. Zytotoxizität	19
1.6.2. Induktion von reaktiven Sauerstoffpezies (ROS)	21
1.6.3. Partikelinduzierte Signaltransduktion	24
1.7. Motivation	26
1.8. Ziele der Arbeit	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Material	31
2.1.1. Verwendete Geräte	31
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3. Chemikalien	33
2.1.4. Lösungen	35
2.1.5. Inhibitoren und Antioxidantien	38
2.1.6. Antikörper	38
2.1.6.1. Primäre Antikörper	38
2.1.6.1.1. Antikörper für Western Blot	38
2.1.6.1.2. Antikörper für Immunfluoreszenz <i>in vivo</i>	39
2.1.6.1.3. Antikörper für Immunfluoreszenz <i>in vitro</i>	39

2.1.6.2. Sekundäre Antikörper	40
2.1.6.2.1. HRP-markierte Antikörper	40
2.1.6.2.2. Fluoreszenz-markierte Antikörper	40
2.1.7. Modellpartikel-System	41
2.1.7.1. Kohlenstoff	41
2.1.7.2. Siliziumdioxid	41
2.1.7.3. Titandioxid	41
2.1.7.4. Manganoxid	42
2.1.8. Zelllinie	43
2.1.9. Versuchstiere	43
2.1.10. Software	43
2.2. Methoden	44
2.2.1. Partikelsynthese	44
2.2.1.1. Hausmannit (Mn_3O_4)	44
2.2.1.2. Mangandioxid (MnO_2)	44
2.2.2. Charakterisierung der Mangan-Partikel	44
2.2.3. Zellkultur	46
2.2.3.1. Kultivierung der Zelllinie RLE-6TN	46
2.2.3.2. Kultivierung der Zelllinie RLE-6TN für Versuche	47
2.2.4. Versuchstiere	47
2.2.4.1. Versuchstierhaltung	47
2.2.4.2. Behandlung der Versuchstiere	48
2.2.4.3. Gewinnung des Lungengewebes	48
2.2.5. Histologie	48
2.2.5.1. Anfertigung von Gefrierschnitten	48
2.2.5.2. Hämatoxylin/Eosin-Färbung	49
2.2.5.3. Immunfluoreszenz-Färbung <i>in vivo</i>	49
2.2.6. Partikelaufnahme	50
2.2.6.1. Granularität in vitalen Zellen	50
2.2.6.2. Granularität in vitalen Zellen bei inhibierter Endozytose	50
2.2.7. Zytotoxizitätsassays	51
2.2.7.1. WST-1-Assay	51
2.2.7.2. Neutralrot-Assay	52

2.2.7.3.	Trypanblau-Assay	52
2.2.7.4.	Proliferations-Assay mit Trypanblau	53
2.2.8.	Messung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	53
2.2.8.1.	Messung der ROS-Generierung im zellfreien System mittels Fluorometrie	53
2.2.8.2.	Durchflusszytometrische Messung der intrazellulären ROS-Generierung mittels H ₂ DCF-DA	54
2.2.8.3.	Durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Superoxid-Generierung mittels MitoSox-Red	54
2.2.9.	Proteinbiochemische Methoden	55
2.2.9.1.	Zelllyse und Proteinextraktion	55
2.2.9.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	55
2.2.9.3.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
	Western Blot Transfer	56
2.2.9.4.	Immunologischer Proteinnachweis durch Chemilumineszenz	57
2.2.9.5.	Densitometrische Auswertung von Immunsignalen	57
2.2.10.	Immunfluoreszenz-Färbung <i>in vitro</i>	57
2.2.10.1.	IF-Färbung zur mikroskopischen Analyse	57
2.2.10.2.	IF-Färbung zur Hochdurchsatz-Analyse	58
2.2.10.3.	Messung der intrazellulären ROS-Generierung mit DHE	59
2.2.10.4.	Auswertung der Immunfluoreszenz-Intensität	59
2.2.11.	Statistik	59
2.2.12.	Abbildungen	60
3.	Ergebnisse	61
3.1.	Modellpartikel-System	62
3.1.1.	Nanopartikel-spezifische Aktivierung von MAP-Kinasen <i>in vivo</i>	62
3.1.2.	Einfluss der Modellpartikel auf die Viabilität von RLE-Zellen	69
3.1.3.	Untersuchung MAPK-spezifischer Signalprozesse mit einer Mikroskopie-basierten „ <i>Medium throughput</i> “- Methode	71
3.1.4.	Membran-abhängige, partikelinduzierte Signaltransduktion	84

3.2. Moderne Nanomaterialien: Manganoxide	87
3.2.1. Partikelcharakterisierung	87
3.2.2. Einfluss von Manganoxid-NP auf die Viabilität von RLE-Zellen	88
3.2.3. Partikelaufnahme	91
3.2.3.1. Granularität in vitalen Zellen	91
3.2.4. Partikelinduzierte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	94
3.2.5. Partikelinduzierte Signaltransduktion mittels Western Blot-Methode	98
3.2.6. Partikel-induzierte ROS-Generierung und der Einfluss auf membranabhängige Signalwege	99
3.2.7. Membranabhängige, partikelinduzierte Signaltransduktion	103
4. Diskussion	105
4.1. Relevanz des in vitro Systems	106
4.2. Membranabhängige Signalwege, ausgelöst durch moderne Nanomaterialien	110
4.3. Einfluss der Redox-Aktivität auf mitochondrielle Prozesse	121
5. Zusammenfassung	124
6. Summary	125
7. Literatur	126
Danksagung	144
Lebenslauf	145

Abkürzungen

∅	Durchmesser
AcOH	Essigsäure
A. dest	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CNP	Kohlenstoff-Nanopartikel
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CP	Kohlenstoff-Partikel
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
DHE	Dihydroethidin
DLS	<i>dynamic light scattering</i> (dynamische Lichtstreuung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGF-R	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Antikörper-basiertes Nachweisverfahren)
ERK	extrazellulär-regulierte Kinasen
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
FCS	<i>fetal calb serum</i> (fötales Kälberserum)
FSC	<i>forward light scatter angle</i>
fSi	feines Siliziumdioxid
fTi	feines Titandioxid
g	Gravitation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBSS+/+	<i>Hank's Buffered Saline Solution</i> +Ca ²⁺ /+Mg ²⁺ (gepufferte Kochsalz-Lösung mit Kalzium und Magnesium)
HCS	<i>High Content screening</i> (Hochdurchsatz-Messung)
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
JNK	Jun N-terminale Kinasen
KG	Körpergewicht
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEK	MAP-Kinasen-Kinasen
NAC	N-Acetylcystein

NP	Nanopartikel
NR	Neutralrot
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalz-Lösung
PFA	Para-Formaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rel.	Relative
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation</i>
RLE-Zellen	Rattenlungenepithel-Zellen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFK	<i>src-Family Kinase</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	<i>side scatter angle</i>
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
u.a.	unter anderem
UFP	ultrafeine Partikel (aerodynamischer Durchmesser < 100 nm)
ufSi	ultrafeines Siliziumdioxid
ufTi	ultrafeines Titandioxid
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent (Volumen/Volumen)
WST-1	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Ziegennormalserum

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

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat die Verwendung und Verbreitung von Nanopartikeln stark zugenommen. Durch die wachsende Anzahl der Einsatzmöglichkeiten von Nanopartikeln ist die Nanotechnologie zu einem wichtigen Wirtschaftszweig heran gewachsen. Dadurch hat sich in den letzten Jahren die Wahrscheinlichkeit der Exposition des Menschen stark erhöht, so dass vermehrt die Frage nach ihrer toxikologischen Relevanz gestellt werden muss.

Allgemein werden Partikel als Nanopartikel (NP) bezeichnet, wenn ihr Durchmesser in einer Dimension unter 100 nm beträgt. Da jedoch das Europäische Umweltbüro eine exaktere Definition gefordert hat (EEB statement 18.10.2011), hat die EU-Kommission im Oktober 2011 eine überarbeitete Definition veröffentlicht. Diese besagt, dass ein Nanomaterial „ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material ist, das Partikel im ungebundenen Zustand als Aggregat oder Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 Prozent der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 bis 100 nm haben.“ (Amtsblatt der Europäischen Union, 2011/696/EU). Somit werden auch größere Aggregate als Nanomaterialien bezeichnet, da aus diesen möglicherweise einzelne Partikel freigesetzt werden können und Aggregate und Agglomerate die Oberflächeneigenschaften von Nanomaterialien innehaben. Des Weiteren wurde festgelegt, dass Materialien, die eine spezifische Oberfläche größer als $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ aufweisen, ebenfalls als Nanomaterialien anzusehen sind.

1.1. Toxikologische Relevanz von Nanopartikeln

Betrachtet man den Ursprung von NP, kann zwischen zwei Klassen unterschieden werden: den Umwelt-Nanopartikeln, sowie den industriell hergestellten NP (Englisch: *engineered nanomaterials ENM*). Zur Klasse der Umwelt-Nanopartikel gehören alle Partikel, die aus anthropogenen und natürlichen Quellen in die Umwelt gelangen. Besondere Bedeutung innerhalb dieser Klasse haben verbrennungsgenerierte NP, die beispielsweise durch Abgase von Kraftfahrzeugen oder bei industriellen Prozessen als Nebenprodukte anfallen (Donaldson *et al.* 2005). Beim Auftreten dieser Partikel in der Luft wird zwischen verschiedenen Fraktionen unterschiedlicher Größe unterschieden, wobei die Fraktion der NP als $\text{PM}_{0,1}$ (*particulate matter* $< 0,1 \mu\text{m}$) bezeichnet wird. Zu den ENM gehören Nanopartikel und –materialien, die für gezielte Anwendungen hergestellt werden, beispielsweise in der Kosmetik- oder Verpackungsindustrie, der Medizin oder auch als Lebensmittelzusätze.

Zu Umwelt-NP gibt es zahlreiche Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten pulmonaler Erkrankungen und einer erhöhten Exposition des Menschen aufzeigen (Donaldson *et al.* 1998). Zu industriell hergestellten NP existieren bisher nur wenige Studien, die einen Hinweis auf eine Toxizität beim Menschen geben. Dennoch ist eine toxikologische Bewertung und Untersuchung dieser NP wichtig und sinnvoll, da aufgrund der bisherigen Erfahrungen mit Umweltpartikeln und Ergebnissen aus *in vitro* und *in vivo* Studien eine potentielle Humantoxizität industriell hergestellter NP nicht ausgeschlossen werden kann. Erst 2014 wurde eine Studie veröffentlicht, die den Zusammenhang zwischen der Exposition von Arbeitern mit nanopartikulärem *Carbon black* und einer reduzierten pulmonalen Funktion zeigen konnte (Zhang *et al.* 2014).

Seit bekannt ist, dass NP humantoxikologisch relevant sind, wurde mehrfach versucht, eine Vorhersage der toxischen Effekte von NP basierend auf ihren speziellen physikalischen und chemischen Eigenschaften zu treffen. Zu diesen gehören unter anderem die Form, Oberfläche, Oberflächenchemie, Ladung, chemische Zusammensetzung, Kristallstruktur, Porosität, sowie Agglomerationsverhalten (Oberdörster *et al.* 2005a). Um das toxikologische Risiko von NP zu charakterisieren und einzustufen, ist neben der Betrachtung der chemischen und physikalischen Eigenschaften eine Bewertung und Analyse von Expositionsszenarien, sowie Dosis-Wirkungs-Beziehungen notwendig.

Der genaue Mechanismus, bzw. die genaue Eigenschaft von NP, die für ihre toxikologisch relevanten Effekte auf biologische Systeme verantwortlich ist, ist jedoch weiterhin unklar. Bislang ist es nicht möglich, eine genaue Verbindung zwischen den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Partikel und den Auswirkungen auf bestimmte zelluläre Mechanismen herzustellen. Allein die Induktion pulmonarer Entzündung nach Partikelinhalation ist das Resultat einer Kombination von Partikeldeposition, Clearance und Interaktion der Partikel mit verschiedenen Zelltypen (Braakhuis *et al.* 2014).

1.2. Zielorgane von Nanopartikeln

Angesichts der Vielzahl von vorkommenden NP in der Umwelt, insbesondere als Aerosole in der Atemluft, ist die Inhalation eine der wichtigsten Expositionsrouten für den Menschen. Dies gilt jedoch nicht nur für Umweltpartikel, sondern ebenfalls für industriell hergestellte Nanomaterialien, wenn sie in der Lage sind, ebenfalls Aerosole zu bilden. Da die Nachfrage nach neuen Anwendungsmethoden von ENM stetig größer wird und immer mehr ENM-haltige Verbraucherprodukte auf den Markt gebracht werden, muss man sich für diese Materialien die Frage nach möglichen humanen Aufnahmewegen und Expositionsszenarien stellen.

Werden ENM für gezielte Anwendungen am Menschen hergestellt, kann man von einer „beabsichtigten Exposition“ ausgehen. Dies ist zum Beispiel bei Kosmetikprodukten oder Lebensmittelzusätzen der Fall. Dennoch kann es für diese Materialien auch zu einer „unbeabsichtigten Exposition“ kommen, zum Beispiel bei der Entwicklung und Produktion dieser Materialien, oder auch bei der Anwendung von ENM-haltigen Aerosolen und Sprays (Deodorant, Pflanzenschutzmittel, Desinfektionsmittel, etc.). Besonders am Arbeitsplatz, im Herstellungsprozess oder bei der Weiterverarbeitung ist die Exposition wahrscheinlich und eine mögliche inhalative Aufnahme wird, im Zusammenhang mit Maßnahmen der Arbeitsplatzsicherheit vermehrt diskutiert (Vance & Marr, 2015).

Im Falle einer inhalativen Exposition durch ENM ist die Lunge das primäre Zielorgan bei der Untersuchung der toxikologischen Effekte von NP (Maynard *et al.* 2005; Christensen *et al.* 2010). Es existieren zahlreiche Publikationen, die die toxikologischen Effekte von verschiedenen ENM in Tierversuchen untersucht haben (Brown *et al.* 2014; Magdolenova *et al.* 2014). Angesichts ihrer geringen Größe sind NP in der Lage, bis in die untersten Regionen der Lunge vorzudringen und dort mit den Epithelzellen zu interagieren. Die Auswirkungen der Partikelbelastung in der Umwelt auf die Sterberate und Häufigkeit pulmonaler Erkrankungen wurde in epidemiologischen Studien bereits mehrfach untersucht (Schwartz & Marcus, 1990; Luechinger, 2014; Shaposhnikov *et al.* 2014). Bereits 1995 wurde gezeigt, dass sich ultrafeine Partikel in den alveolaren Bereichen der Lunge ablagern können und dort zu inflammatorischen Reaktionen führen (Seaton *et al.* 1995). Mehrere Arbeitsgruppen haben im Anschluss den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Asthmaerkrankungen und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*; chronisch obstruktive Lungenerkrankung) in Gebieten mit erhöhter Partikelkonzentration in der Atemluft hergestellt (Donaldson *et al.* 1998; Halonen *et al.* 2008; Dadvand *et al.* 2014; To *et al.* 2015).

Es existieren bereits einige Studien, die sich mit der Humanexposition von ENM und den daraus entstehenden molekularen Effekten beschäftigen. In einer Kohortenstudie konnte gezeigt werden, dass Arbeiter, die mit ENM arbeiten, erhöhte Marker aufweisen, die spezifisch für kardiovaskuläre Erkrankungen, oxidativen Stress und Entzündungen stehen (Liao *et al.* 2014). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Exposition und dem Auftreten bestimmter Erkrankungen wurde bisher allerdings nicht gezeigt.

Die Haut, als größtes menschliches Organ, ist permanent der Belastung durch Fremdstoffe ausgesetzt. Dabei kann es über in der Luft befindliche NP oder Aerosole zur Aufnahme kommen. Brenner und Neu-Baker (2014) beschreiben eine Kontamination verschiedener Arbeitsflächen mit Metalloxid-NP in einer Halbleiterfabrik. Aufgrund dieser Kontaminationen ist eine dermale Exposition der Facharbeiter wahrscheinlich und eine entsprechende Risikobewertung dieser NP am Arbeitsplatz notwendig.

In *in vitro* Untersuchungen an humanen Keratinozyten konnten bereits molekulare Effekte von ENM gezeigt werden. Park *et al.* zeigten 2013, dass Siliziumdioxid-NP abhängig von ihrer Größe, als auch von ihrer Oberflächenladung, unterschiedliche Effekte auf die Zellviabilität sowie die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies haben. In einer weiteren Studie mit Siliziumdioxid-NP wurde die Penetration in unterschiedliche Hautschichten in einem Hautmodell untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass NP mit einer positiven Oberflächenladung nicht in die Haut aufgenommen werden. Wenn allerdings Hautschädigungen vorhanden waren, konnten alle Partikel, unabhängig ihrer Ladung durch die Haut penetrieren (Rancan *et al.* 2012). Aus diesem Grund muss bei einer Risikoabschätzung von ENM in Kosmetika und Arzneimitteln die Interaktion von Partikeln mit der Haut berücksichtigt werden, da für Patienten mit Hautkrankheiten und Schädigungen der oberen Hautschichten möglicherweise andere Aufnahmemechanismen gelten und es so zu einer unbeabsichtigten Exposition tieferliegender Hautschichten kommen kann. Für NP, die möglicherweise toxische Effekte in humanen Zellen induzieren können, kann es im Falle einer unbeabsichtigten Aufnahme zu Krankheiten wie Kontaktdermatitis, sowie allergischen Reaktionen kommen (Nafisi *et al.* 2014).

ENM werden ebenfalls in Verpackungsmaterialien eingesetzt und können somit potentiell auch auf die enthaltenen Nahrungsmittel übergehen. Aus diesem Grund ist der Verdauungstrakt ebenfalls ein direktes Zielorgan für die Exposition mit NP. Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl Mikro- als auch Nanopartikel in der Lage sind, durch den GIT (Gastrointestinalen Trakt) zu penetrieren, wobei die Absorptionsrate für NP 15- bis 250-fach höher ist, je nach chemischer Zusammensetzung (Desai *et al.* 1996).

Besonders zu beachten sind hierbei die in den verschiedenen Abschnitten sehr unterschiedlichen pH-Werte, durch die die Partikeloberfläche, -ladung und Aggregatbildung beeinflusst werden kann (Horter & Dressmann, 2001).

Aufgrund ihrer geringen Größe werden NP von vielen Schutzbarrieren der Organe nicht erkannt. Sie können ungehindert Zellmembranen passieren und in den Blutkreislauf oder das lymphatische System eindringen und so systemisch im ganzen Körper verteilt werden (Nemmar *et al.* 2002; Nabeshi *et al.* 2011b). Genter *et al.* veröffentlichten 2012 eine Studie, in der C57BL/6J-Mäusen Silber-NP intranasal appliziert wurden. Nach 1 und 7 Tagen konnten sie die aggregierten NP neben der Lunge auch in der Niere und der Milz nachweisen.

In einer 28-Tage Studie mit Ratten konnten oral applizierte Silber-NP in allen wichtigen Organen nachgewiesen werden, der größte Anteil befand sich hierbei in Leber und Milz (van der Zande *et al.* 2012). In einer weiteren Studie wurden Ratten mit Mangan-NP-Aerosolen behandelt und es konnte gezeigt werden, dass sich der Mangangehalt in der Lunge verdoppelte, während der Gehalt im *Bulbus olfactorius* auf das 3,5-fache anstieg. Auch in anderen Bereichen des Gehirns konnten erhöhte Mn-Werte nachgewiesen werden (Elder *et al.* 2006).

In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien durchgeführt die zeigen, dass der Eintritt von NP in das kardiovaskuläre System nicht nur zu einer systemischen Verteilung führt, sondern auch Auswirkungen auf Alterungsprozesse und verschiedene kardiovaskulär-bedingte Erkrankungen haben kann (Brook *et al.* 2004; Chen *et al.* 2014; Pope *et al.* 2015).

Alle diese Studien weisen darauf hin, dass sich NP systemisch verteilen können und somit einen Einfluss auf nahezu alle Organe haben können. Für eine aussagekräftige Risikobewertung einzelner Stoffe müssen dazu die Expositionsszenarien und mögliche Risikofaktoren betrachtet werden. Dennoch zeigen alle diese Ergebnisse, dass eine genaue Untersuchung der toxikologischen Eigenschaften von NP notwendig ist.

1.3. Zusammensetzung von Nanopartikeln

Die Zusammensetzung von NP hat einen entscheidenden Einfluss auf ihre Toxizität. Besonders metallhaltige NP sind aufgrund ihrer möglichen Dissoziation und Redoxaktivität toxikologisch interessant. Um eventuelle chemische Eigenschaften als Ursache für toxische Effekte zu identifizieren, wurden für die nachfolgende Arbeit NP unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung ausgewählt. Dazu gehören Kohlenstoff-Partikel (CNP), als nicht-metallische Partikel. Des Weiteren Siliziumdioxid, als halbmimetallische Komponente, sowie Titandioxid als Repräsentant eines Redox-inerten Übergangsmetalls. Als Beispiel für ein Redox-aktives Übergangsmetall wurden Mangandioxid-Partikel verwendet, die darüber hinaus in unterschiedlichen Formen (kugelförmig, sowie faserartig), als auch mit unterschiedlichen Oxidationsstufen synthetisiert werden konnten. Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Partikel, sowie eventuelle toxikologische Vorkenntnisse erläutert.

1.3.1. Kohlenstoffhaltige Nanopartikel

Kohlenstoffhaltige NP zählen zu den am häufigsten untersuchten NP. Dies liegt unter anderem daran, dass sie als Modellpartikel für Umwelt-NP verwendet werden (BeruBé et al. 2007). Ein weiterer Grund ist jedoch, dass sie leicht modifiziert werden können und in unterschiedlichen Formen und Gestalten hergestellt und für industrielle Zwecke eingesetzt werden können.

Carbon black:

Carbon black, im Deutschen auch Industrieruß genannt, besteht zu nahezu vollständig aus reinem Kohlenstoff. Es entsteht bei der unvollständigen Verbrennung von Kohlenwasserstoffen (Robertson & Smith, 1994). Industriell hergestelltes *Carbon black* enthält ca. 97% reinen Kohlenstoff, zusätzlich variable Mengen an Schwefel, Sauerstoff und Wasserstoff. Weniger als 1% entfällt auf organische Verbindungen, die an der Oberfläche der Partikel anhaften können. Dazu gehören vor allem PAK (Polyaromatische Kohlenwasserstoffe), wie Benzo(a)pyren, Coronen und Fluoranthen. Einige dieser PAK sind bekannte humane Karzinogene. In der Industrie wird *Carbon black* hauptsächlich zur Verstärkung von Natur- und Synthetikgummi sowie als Farbpigment eingesetzt.

Die Partikelgröße von industriell hergestelltem, nanopartikulärem *Carbon black* variiert zwischen 10 und 100 nm. Diese formen jedoch schnell Aggregate, die sich wiederum zu größeren Agglomeraten zusammenlagern können. Aufgrund ihrer primären Partikelgröße werden *Carbon black* Materialien als Nanomaterialien bezeichnet (Scientific Committee on Consumer Safety, 2014).

Die toxischen Eigenschaften von *Carbon black* werden zum einen durch die primäre Partikelgröße, bzw. den Anteil an Kohlenstoff Nanopartikeln (CNP), aber auch durch eventuell an der Oberfläche absorbierte PAK bestimmt. Es existieren zahlreiche Studien, die die Relevanz der Toxizität von CNP in verschiedenen Zelllinien und Tierversuchs-Modellen bereits untersucht haben. Die meisten Studien beschäftigen sich dabei mit der Inhalation der Partikel und konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass CNP, abhängig von ihrer Oberfläche, pulmonale Entzündungen auslösen können (Duffin *et al.* 2002; Oberdörster *et al.* 2005b; Stoeger *et al.* 2006). Des Weiteren führt die Belastung mit CNP in ICR-Mäusen zu einer gezielten Erhöhung der Proliferation alveolarer Typ II-Zellen (Chang *et al.* 2012).

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Studien der vergangenen Jahre ebenfalls herausgefunden, dass inhalierte CNP neben dem respiratorischen System auch das kardiovaskuläre System, das zentrale Nervensystem (ZNS), sowie weitere Organe beeinflussen können (Donaldson *et al.* 2005; Erdely *et al.* 2008).

In einer Studie von Umezawa *et al.* (2011), wurde gezeigt, dass Nachkommen von Mäusen, die mit CNP belastet wurden, erhöhte Collagen-Werte in der Niere zeigten, die mit renaler Fibrose in Zusammenhang gebracht werden. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass sowohl eine ungesunde Ernährung, als auch Belastung mit CNP zu ähnlichen Effekten in kardiovaskulären Zellen führen, die mit Alterung sowie kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (Büchner *et al.* 2013).

CNT:

Eine relativ neue Form der Kohlenstoff-haltigen Nanomaterialien sind Nanoröhren (*Carbon nanotubes* = CNT), die erst seit Beginn der 90er Jahre bekannt sind (Iijima, 1991). Diese können einwandig, als *single-walled* (SWCNT) oder mehrwandig, als *multi-walled carbon nanotubes* (MWCNT) hergestellt werden. CNT leiten sich von Graphen ab, welches zu einer Röhre aufgerollt wird. Die Wände bestehen aus sechseckig angeordneten Kohlenstoff-Atomen, die eine wabenförmige Struktur bilden.

Die meisten Röhren haben einen Innen-Durchmesser von 1 bis 50 nm, es wurden jedoch schon einzelne Röhren synthetisiert, die einen Durchmesser von 0,4 nm haben. In der Länge variieren sie von mehreren Millimetern bis in den Zentimeter-Bereich (Iijima, 2002).

Ebenso wie Graphit besitzen auch CNT halbleitende oder leitende Eigenschaften. Aus diesem Grund werden sie unter anderem in Elektroden und Transistoren eingesetzt. Hergestellt werden CNT über Lichtbogenentladung zwischen zwei Kohlenstoffelektroden, mit einer Lasermethode oder durch die katalytische Zersetzung von Kohlenwasserstoffen. Alle drei Methoden eignen sich mittlerweile zur gezielten Herstellung von Nanoröhren definierter Länge und Durchmesser (Foldvari & Bagonluri, 2008a, b).

Verschiedene Arten von CNT wurden bereits in diversen Studien untersucht, z.B. SWCNT, MWCNT, aufbereitete, nicht aufbereitete, rückständige Übergangsmetalle aus Katalysatoren, sowie CNT mit funktionalisierten Gruppen, um zu verstehen, welche physicochemischen Charakteristika die Toxikologie der Partikel beeinflussen.

Dabei wurde herausgefunden, dass SWCNT eine höhere Toxizität in humanen Fibroblasten aufweisen, als MWCNT, CNP und Graphit (Jia *et al.* 2005). Zusätzlich zeigt die Behandlung mit Säure, zur Aufreinigung der CNT und Entfernung metallkatalytischer Rückstände, eine Erhöhung der Toxizität, im Vergleich zu nicht aufgereinigten CNT (Tian *et al.* 2006). Diese Befunde werden unterstützt von weiteren Studien, in denen die Säure-Behandlung, sowie Funktionalisierung von SWCNT das Ausmaß der Toxizität auf humane Lungen-Tumorzellen und primäre Immunzellen beeinflusst (Dumortier *et al.* 2006; Magrez *et al.* 2006).

Die Funktionalisierung von SWCNT mit wasserlöslichen, funktionellen Gruppen scheint einen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von primären Immunzellen zu haben, während nicht-funktionalisierte CNT zu intrazellulärem oxidativem Stress und Apoptose in verschiedenen Zellsystemen führen (Cui *et al.* 2005; Ding *et al.* 2005; Manna *et al.* 2005; Monteiro-Riviere *et al.* 2005; Bottini *et al.* 2006).

Aufgrund ihrer Form gibt es einige Überlegungen, dass CNT ähnliche Reaktionen auslösen können, wie Asbest. Es gibt dazu bereits einige Studien, die diesen Verdacht erhärten, aufgrund der inflammatorischen Reaktionen, ausgelöst durch CNT (Shvedova *et al.* 2005; Poland *et al.* 2008; Castranova, 2011). Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass längere Nanofasern zu Entzündungsreaktionen in der Lunge führen können, die für kürzere Fasern nicht beobachtet wurden. Dies könnte begründet sein durch die Generierung von oxidativem Stress oder anderer Faktoren.

Aufgrund der möglichen adversen Eigenschaften wurde eine Mindestlänge von 5 μm festgesetzt; sind CNT länger, besteht ein erhöhtes Risiko inflammatorischer Reaktionen in der Lunge (Schinwald *et al.* 2012; Donaldson *et al.* 2013).

Trotz ihrer möglicherweise kanzerogenen Wirkung werden CNT seit mehreren Jahren gezielt modifiziert und funktionalisiert, um sie als Medikamenten-Transporter gezielt zur Behandlung von Tumoren bei Krebs-Patienten einsetzen zu können (Klumpp *et al.* 2006; Prakash *et al.* 2011; Ren *et al.* 2012).

1.3.2. Metall-haltige Nanopartikel

Viele verschiedene Partikel, insbesondere industriell hergestellte, enthalten eine metallische Komponente. Die Metalle aus der Gruppe der Übergangsmetalle haben sich in zahlreichen Untersuchungen als toxikologisch relevant erwiesen. Dazu zählen u.a. Eisen (Fe), Nickel (Ni), Titan (Ti), Vanadium (V), Silber (Ag) und Mangan (Mn) (Schwarze *et al.* 2006; Mossmann *et al.*, 2007; Huang *et al.* 2010). Aber auch für andere Metalle oder Halbmetalle, wie z.B. Silizium (Si), Aluminium (Al) und Zinn (Sn) sind toxische Effekte gezeigt worden (Zayed *et al.* 2014; Tabei *et al.* 2015). Die Entstehung biologischer, bzw. gesundheitlicher Effekte liegt vor allem in ihrer oxidativen Aktivität begründet (Gilmour *et al.* 1996).

Siliziumdioxid:

Silizium ist ein Element aus der Gruppe der Halbleiter. Die häufigste Verbindung ist Siliziumdioxid, welches das am häufigsten vorkommende Mineral in der Erdkruste ist. In der Natur existiert sowohl amorphes, als auch kristallines SiO_2 . Beide unterscheiden sich in ihrer Molekülanordnung im Kristallgitter. Während die Moleküle bei kristallinem SiO_2 (Quarz) gleichmäßig in einem Kristallgitter angeordnet sind, befinden sie sich bei amorphem SiO_2 in einer willkürlichen Anordnung.

Quarz wird hauptsächlich als Rohstoff für die Glasindustrie und das Bauwesen verwendet. Nano- SiO_2 wird beispielsweise in der Autoindustrie eingesetzt. Dort wird es zusammen mit Carbon black Autoreifen beigemischt, um die Reibung zu verringern und so den Kraftstoffverbrauch zu senken (Hessen-Nanotech NEWS 4/2006).

Für kristallines Silica ist schon seit längerem bekannt, dass es bei inhalativer Aufnahme zu COPD, Silicose und Lungenkrebs führen kann (Hnizdo & Vallyathan. 2003), wohingegen amorphes Silica als relativ sicher betrachtet wird.

Die speziellen Eigenschaften amorpher Silica-NP, z.B. große Oberfläche, veränderliche Porengröße, biologische Abbaubarkeit oder einfache Oberflächenmodifikationen, sind der Grund für ihre Anwendung in der biologischen Applikation, u.a. als Transporter für Therapeutika oder für funktionelle Imaging-Methoden (Pasqua et al. 2009; Morales-Avila et al. 2012).

Bezüglich der Toxizität von amorphen Silica-NP ist die Sachlage sehr unklar. Während eine Arbeitsgruppe eine größenabhängige Wirkung von Silica-NP auf die Viabilität von Maus-Keratinocyten nachweisen konnte (Kyung et al. 2009), zeigte eine andere Gruppe, dass sie in humanen Hepatozyten keine größen- oder oberflächenabhängige Toxizität aufweisen (Lu et al. 2011). Neben ihrer Auswirkung auf die Viabilität, konnte in weiteren in vitro-Studien gezeigt werden, dass Silica-NP intrazelluläre ROS generieren, die zu DNA-Schädigungen führen können (Nabeshi et al. 2011a). Ebenso kann die Belastung mit Silica-NP zu der Bildung von Protein-Aggregaten (Chen et al. 2008), Membranschädigungen (de Planque et al. 2011), sowie der Induktion apoptotischer Signalwege und Zellzyklus-Arrest führen (Wang et al. 2009; Ye et al. 2010).

In einer aktuell erschienenen Studie von Kim et al. (2015) wurden Silica-NP unterschiedlicher Größe in verschiedenen Zelllinien getestet. Während die toxischen Effekte in TypII-Lungenepithelzellen hauptsächlich durch die Generierung von ROS begründet sind, reagierten embryonale Mausfibroblasten sehr sensitiv auf die Belastung. Im Gegensatz dazu reagierten humane Hepatozyten am wenigsten empfindlich auf die Belastung mit Silica-NP und zeigten darüber hinaus weder eine dosis- noch größenabhängige Antwort. Die toxischen Effekte, ausgelöst durch Silica-NP, scheinen somit abhängig vom gewählten Zelltyp zu sein (Kim et al. 2015).

Titandioxid:

Titan ist ein Element aus der Gruppe der Übergangsmetalle. Als Titandioxid bildet es Kristalle, die drei unterschiedliche Strukturen annehmen können. Rutil, Anatas und Brookit. Titandioxid ist thermisch stabil mit einer Schmelztemperatur über 1800°C und wird als chemisch inert angesehen. Da es darüber hinaus sehr preiswert und einfach herzustellen ist, findet es zum größten Teil Anwendung als weißer Farbstoff, z.B. in Lacken, Farben aber auch Kosmetika und Zahnpasta (Fisher & Egerton, 2001).

Aufgrund seiner photokatalytischen Eigenschaften wird es auch in der technischen Industrie eingesetzt, unter anderem zur Elektrolyse von Wasser zu Wasserstoff (Yousef *et al.* 2015), in Solarzellen (Chen *et al.* 2011; Chandiran *et al.* 2013), zur Wasseraufbereitung (Lazar *et al.* 2012) oder in selbstreinigenden Beschichtungen (Kamegawa *et al.* 2012; Lu *et al.* 2015). Auch in der modernen Medizin wird Titandioxid eingesetzt, u.a. als Biosensoren (Wang *et al.* 2014), Transporter für Medikamente (Venkatasubbu *et al.* 2013) oder als Wirkstoff-Träger zur Therapie von Krebs (Bogdan, 2015).

Neben den hilfreichen Eigenschaften und Anwendungen von Titandioxid, gibt es auch Hinweise auf eine Toxizität der Partikel. Bereits 2010 wurde Titandioxid als Kanzerogen der Klasse 2B (möglicherweise kanzerogen für den Menschen) eingestuft (IARC Monographs, Volume 93). Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Formen von Titandioxid bereits in mehreren Studien *in vivo* und *in vitro* untersucht. Es gibt zwar vereinzelte Hinweise auf Unterschiede zwischen den Strukturen, allerdings variieren diese Unterschiede je nach verwendeter Zelllinie oder verwendetem Tiermodell (Jin *et al.* 2011; Numano *et al.* 2014).

Bereits in einer Studie aus dem Jahr 2000 konnte gezeigt werden, dass Titandioxid-NP in der Anatase-Form von 20 nm nach intratrachealer Instillation zu pulmonaler Entzündung in Ratten und Mäusen führen. Wurden größere Partikel von 250 nm eingesetzt, konnte erst bei höherer Partikelbelastung ein Effekt beobachtet werden (Oberdörster *et al.* 2000). Es konnte daraufhin ein Zusammenhang zwischen der Toxizität und der Oberfläche der Partikel hergestellt werden.

Manganoxid (Mn₃O₄/MnO₂):

Mangan ist ein Element der Übergangsmetalle und ähnelt in seinen physikalischen Eigenschaften dem Eisen. In der Natur liegt es hauptsächlich als MnO₂ vor. Alle Oxidationsstufen des Mangans besitzen charakteristische Farben. So sind Salze mit Mangan(II)-Ionen farblos (MnCl₂), dreiwertige sind rot (Mn₂O₃), vierwertige braun (MnO₂), fünfwertige blau (MnO₄³⁻), sechswertige grün (MnO₄²⁻) und siebenwertige violett (MnO₄⁻).

Für Mangan gibt es zwei relevante Oxide, die auch Braunstein und Hausmannit genannt werden. Mangandioxid (Braunstein) ist ein unlösliches Oxid des Mangans und hat eine dunkelbraune bis schwarze Färbung. Es wird hauptsächlich als Oxidationsmittel eingesetzt, zum Beispiel in Feuerwerkskörpern, bei der Glasherstellung, um Verfärbungen durch Eisen(III)silikate zu entfernen und katalytisch bei der Spaltung von Wasser zur Wasserstoffgewinnung (Najafpour & Allakhverdiev, 2012).

In Batterien wird es für die Herstellung der Kathoden verwendet (Chen *et al.* 2012; Acznik *et al.* 2014). In der Industrie wird es für die Stahlherstellung und Legierungen benötigt. Es findet aber auch in der Technik Anwendung, beispielsweise als Bestandteil von Trocken-Zell-Batterien, oder in der Ökologie in Organo-Metall-Fungiziden (Frick *et al.* 2011). Als NP werden Mn_3O_4 und MnO_2 als hochwirksame Katalysatoren und in Beschichtungen von Kathoden verwendet (Kim *et al.* 2012; Feng *et al.* 2012).

Mangan hat auch eine biologische Bedeutung. Bei enzymatischen Umsetzungen mit reaktiven Sauerstoffspezies ist es ein essentielles Element und agiert als Kofaktor (Korc, 1988). Bei chronischem Mangel kann es zu Wachstumsstörungen und Skelettdeformationen kommen. Dies ist auf eine verringerte Funktion des Enzyms Glycosyltransferase zurückzuführen (Leach & Lilburn, 1978). Im menschlichen Organismus existieren noch weitere manganhaltige Enzyme, beispielsweise die Superoxiddismutasen, die sich in den Mitochondrien und den Peroxisomen befinden (Bannister *et al.* 1987).

Auch in verschiedenen Organen findet man Mangan als Spurenelement, wie in der Leber, aber auch in sämtlichen Fortpflanzungsorganen, im Besonderen im Uterus während der Schwangerschaft. Es befindet sich ebenso im Thymus und den Nebennierenrinden, sowie in vielen anderen vitaminreichen Organen (Dauderer, Handbuch der Umweltgifte, 2006).

Durch kurzzeitige Exposition mit MnO_2 -Partikeln können Reizerscheinungen an den Atemwegen und Schleimhäuten auftreten, die im schlimmsten Fall zu Lungenentzündung und eventuellen gastrointestinalen Beschwerden führen kann (Dauderer, klinische Toxikologie).

Durch chronische Exposition mit Mangan können Schäden am zentralen Nervensystem auftreten, die zu einer Parkinson-ähnlichen Krankheit führen können (Nielsen *et al.* 2015).

Durch chronische Inhalation kommt es zu Schädigungen des Lungenepithels und in der Folge zu respiratorischen Erkrankungen (Bowler *et al.* 2007). Eine akute Inhalation von Mangan-Aerosolen führt zu einer chemischen Pneumonitis, die charakterisiert wird durch epitheliale Nekrosen und mononukleäre Infiltrationen (Nemery 1990). Die LD_{50} für Manganstaub wurde aufgrund zahlreicher Studien für den Menschen auf 5-8 g oral festgelegt (Dauderer – Klinische Toxikologie).

Mn_3O_4 , auch Hausmannit oder Glanzbraunstein genannt, ist neben MnO_2 die häufigste natürlich vorkommende Form des Mangans. Es bildet dunkelbraune bis schwarze Kristalle und wird meist in Bergwerken zur Gewinnung von Mangan abgebaut. Mangan liegt im Kristall in einer Spinell-Form in unterschiedlichen Oxidationsstufen vor: $Mn(II)Mn(III)_2O_4$.

In vergangenen Studien wurde gezeigt, dass inhalierte Manganoxid-Nanopartikel in das zentrale Nervensystem eindringen können, die in inflammatorischen Veränderungen enden (Elder *et al.* 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Partikel über den respiratorischen Trakt, genauer gesagt über die Nervenenden und das Epithel des *Bulbus olfactorius* in das Gehirn translozieren können (Oberdörster *et al.* 2004; Medina *et al.* 2007).

In alveolaren Makrophagen sowie Epithelzellen wurde eine erhöhte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, verminderte metabolische Aktivität sowie eine verminderte Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach Belastung mit Mn_3O_4 nachgewiesen (Urner *et al.* 2014).

1.4. Einfluss der Protein-Corona auf die Eigenschaften von Nanomaterialien

Die biologische Umgebung beeinflusst die Aufnahme von Partikeln in verschiedene Organe, Gewebe, Zelltypen oder sogar Zellorganellen, die bei der Bewertung und Deutung der beobachteten Effekte, ausgelöst durch NP, berücksichtigt werden müssen. Am häufigsten diskutiert und untersucht ist die Interaktion von NP mit Proteinen aus dem umgebenden Medium (Liu *et al.* 2012). Man geht davon aus, dass NP aufgrund ihrer großen Oberfläche in der Lage sind, Proteine an ihrer Oberfläche zu binden und eine Protein-Corona zu bilden. Dabei unterscheidet man eine „*hard corona*“, bei der die Bindung zwischen Partikel und Proteinen irreversibel ist, und einer reversiblen „*soft corona*“ (Milani *et al.* 2012; Lundqvist *et al.* 2013). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass NP nicht mehr als biologisch „fremd“ von der Zelle erkannt werden und so internalisiert werden (Monopoli *et al.* 2012). Ebenso ist es möglich, dass diese Protein-Corona die Reaktivität der NP beeinflusst (Cedervall *et al.* 2007; Casals *et al.* 2010).

Die genaue Umgebung bzw. Interaktion der Partikel in einem biologischen System ist in der Regel schwer vorhersehbar. In vitro-Studien, in denen Partikel mit unterschiedlichen Proteinen oder Seren beschichtet werden, liefern erste Hinweise auf die Art der Interaktion der Partikel mit Proteinen. In einem vivo-System ist diese Vorhersage schwierig bis unmöglich.

Insbesondere NP können, wenn sie inhaliert werden, bis in die unteren Atemwege vordringen. In den dort befindlichen Bronchiolen und Alveolen können sie sowohl direkt mit Epithelzellen als auch indirekt mit Endothelzellen interagieren und in den Blutstrom gelangen. Es ist ebenfalls möglich, dass sie in die Lymphgefäße eindringen und sich so in den Lymphbahnen anreichern.

In den einzelnen Umgebungen herrschen unterschiedliche biologische Bedingungen, wie Protein-Zusammensetzungen, pH, Ionen-Komposition und enzymatische Aktivitäten. Es wurde bereits gezeigt, dass Nanopartikel, die mit Blutplasma interagieren, über die Zeit eine stetige Änderung ihrer Oberfläche erfahren, aufgrund der konstanten Adsorption und Desorption verschiedener Proteine (Casals *et al.* 2010).

Ebenso denkbar sind mehrfache Schichten von Proteinen auf der Oberfläche. In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Adsorption von Plasma-Proteinen an der Oberfläche von MWCNT abhängig ist von der Vorinkubation der Partikel mit pulmonalen Surfactant-Proteinen (Gasser *et al.* 2010).

Neben den Auswirkungen einer Corona auf die Reaktivität des NPs ist auch die Aktivität des Proteins nicht außer Acht zu lassen. So kann es durch Wechselwirkung der Proteine mit der NP-Oberfläche zu einer Konformationsänderung und somit veränderten Funktion kommen. Für Gold-NP wurden dosisabhängige Strukturänderungen für die Interaktion mit BSA (*bovine serum albumin*) bereits beschrieben (Wangoo *et al.* 2008), wohingegen es zu keiner Veränderung kommt, wenn BSA an der Oberfläche von C60-Fulleren-NP absorbiert wird (Liu *et al.* 2012). Tubulin, ein essentielles Protein im Zytoskelett, zeigte eine Strukturänderung sowie verminderte Polymerisationsrate nach Inkubation mit Titandioxid-NP (Gheshlaghi *et al.* 2008). Diese Struktur- und Funktionsänderung können die Aktivität verschiedener zellulärer Signalwege beeinflussen. Die Bindung an NP kann allerdings auch einen gegenteiligen Effekt haben und das gebundene Protein unterstützen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass verschiedene kovalent an SWCNT gebundene Enzyme selbst unter denaturierenden Bedingungen ihre Struktur und Aktivität beibehalten konnten (Asuri *et al.* 2007).

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass Größe, Form und Oberflächen-Eigenschaften, sowie viele weitere Parameter von NP die Protein-Adsorption an der Oberfläche beeinflussen (Nel *et al.* 2009). Dies kann zu einer veränderten Reaktivität der Partikel, als auch der Proteine führen und die Aufnahme der NP beeinflussen. Die meisten Studien dazu beziehen sich allerdings auf in vitro-Versuche, so dass eine Vorhersage zur Interaktion, sowie tatsächlichen Aufnahme von NP in einen in vivo-System nicht möglich ist und weiterer Untersuchungen bedarf (Saptarshi *et al.* 2013).

1.5. Zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln

Wie bereits weiter oben beschrieben, können NP aufgrund ihrer Größe, durch Membranen penetrieren und so in Zellen oder Organellen aufgenommen werden. Ebenso ist es möglich, dass die Partikel über einen aktiven Membrantransport in die Zelle transportiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass NP zwischen 20-50 nm schneller in Zellen aufgenommen werden, als kleinere oder größere Partikel (Chithrani & Chan 2007). Dennoch muss berücksichtigt werden, dass je nach gewählter Zelllinie der Aufnahmemechanismus variieren kann (Sahay *et al.* 2010). Im nachfolgenden Kapitel sind die unterschiedlichen aktiven und passiven Mechanismen für die Aufnahme von Fremdstoffen in die Zelle beschrieben.

1.5.1. Endozytose

Generell wird, je nach Art des aufzunehmenden Stoffes, zwischen der Phagozytose und der Pinozytose unterschieden. In Abbildung 1.1. sind die verschiedenen Mechanismen der Partikel-Aufnahme schematisch dargestellt.

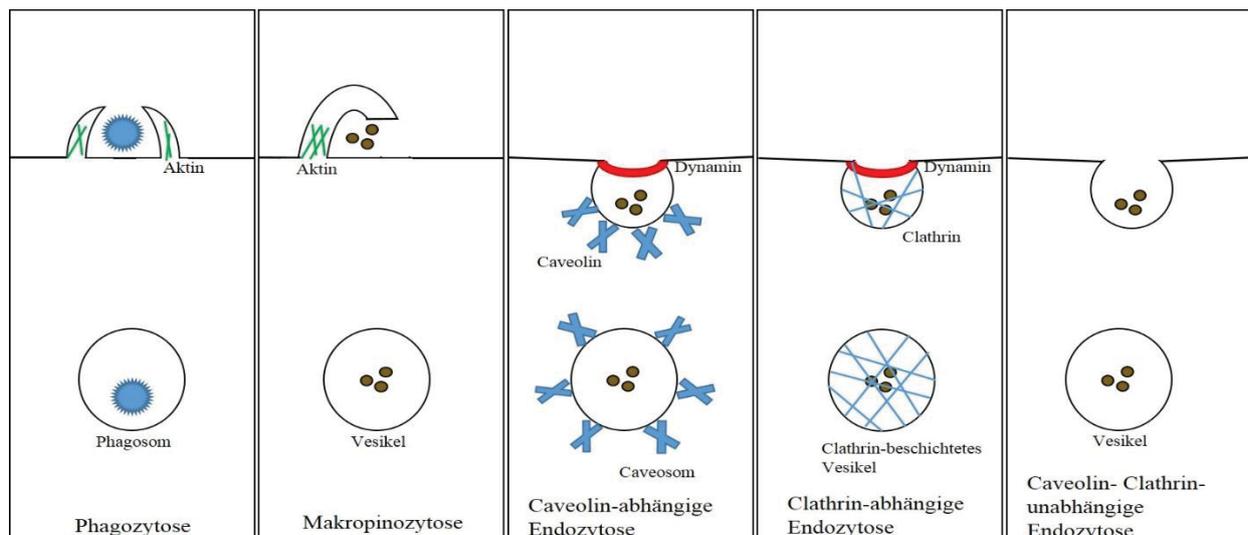


Abb. 1.1: Mechanismen der Endozytose (verändert nach Saptarshi *et al.* 2013).

Phagozytose:

Die Phagozytose ist ein Rezeptor-vermittelter, Aktin-abhängiger Prozess und charakteristisch für Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen (Aderem & Underhill, 1999). Bei der Aufnahme wird der Partikel durch Einstülpungen in der Zellmembran in ein Vesikel, das sogenannte „Phagosom“ eingeschlossen und durch Abschnüren in die Zelle aufgenommen. Die Phagozytose ist ein spezifischer Aufnahmeweg für größere Partikel, beispielsweise Bakterien und Mikropartikel größer als 0,5 µm (Iversen *et al.* 2011). Aber auch für kleinere Partikel im Bereich von 250 nm, bestehend aus Polystyrene konnte eine phagozytotische Aufnahme bereits gezeigt werden (Hillaireau & Couvreur 2009).

Makropinozytose:

Die Pinozytose ist der Oberbegriff für die Aufnahme von Flüssigkeiten und Partikeln, die kleiner als 100 nm sind. Die Makropinozytose ist ebenfalls Aktin-abhängig. Wichtigstes Merkmal ist das so genannte „Kräuseln“ der Zellmembran und das Umschließen des aufzunehmenden Stoffes (Swanson & Watts, 1995). Das dabei gebildete „Pinosom“ variiert in seiner Größe und hat keine erkennbaren Rezeptoren oder spezifische Lokalisation in der Zellmembran (Racoosin & Swanson, 1992).

Caveolin-abhängige Endozytose:

Caveolin ist ein membranständiges Protein und an der Aufnahme verschiedener NP beteiligt. Es existieren 3 verschiedene Formen des Cavolins, auch Caveolin-1, -2 und -3 genannt. Das Vorkommen der verschiedenen Formen ist abhängig vom Zelltyp (Hansen and Nichols 2010; Hayer *et al.* 2010; Parton and Del Pozo 2013). Es wird diskutiert, dass die Aufnahme über Caveolin eine besonders schnelle Art ist, da sie sich in einem Zeitraum von wenigen Sekunden abspielen kann (Oh *et al.* 2007; Mayor *et al.* 2014). Caveolae sind definiert als ca. 60-80 nm große Ausstülpungen in der Zellmembran, die aus oligomerem Caveolin besteht (Parton *et al.* 2007). Die Anzahl dieser Ausstülpungen in einer Zelle variiert abhängig vom Zelltyp. Wird ein Stoff in diesen Ausstülpungen aufgenommen, wird ein Vesikel abgeschnürt und ins Innere der Zelle transportiert. Anschließend wird das Caveolin im Golgi-Apparat der Zelle gespeichert. Nach Anlagerung von Cholesterol kann es dann wieder zur Zellmembran transportiert werden, um weitere Ausstülpungen zu bilden (Pol *et al.* 2005).

Eine Caveolin-abhängige Aufnahme von Nanomaterialien wurde bereits mehrfach gezeigt und erlangte in der Vergangenheit besondere Bedeutung in der Nanomedizin. Beispielsweise Poly(aminopropyl)siloxan (PAPS) werden spezifisch über Caveolae in humanen Aorta-Endothelzellen aufgenommen (Nishikawa *et al.* 2009). Darüber hinaus ist es möglich, NM mit speziellen Oberflächeneigenschaften zu modifizieren, so dass sie spezifisch über Caveolae aufgenommen werden. In einer Studie von Oh *et al.* (2007) konnten kolloidale Gold-NP mit Caveolin-spezifischen Antikörpern modifiziert werden und eine Anreicherung dieser Partikel in den Caveolae des Lungengewebes gezeigt werden.

Clathrin-abhängige Endozytose:

Die clathrin-abhängige Endozytose findet Rezeptor-vermittelt an bestimmten Bereichen der Plasmamembran statt. Diese Bereiche der Membran werden als *Clathrin-coated pits* bezeichnet, die bereits im Jahr 1964 identifiziert werden konnten (Roth & Porter, 1964). An der Außenseite dieser pits, welche eine leichte Ausstülpung nach innen zeigen, befindet sich das Clathrin (Mousavi *et al.* 2004). Bindet ein passender Ligand an die Oberflächenrezeptoren, beginnt die Zelle, eine Ausstülpung der Zellmembran zu bilden, die den Stoff umschließt. Anschließend wird ein abgeschnürter Vesikel, auch *coated pit* genannt, welcher vollständig von Clathrin an der Außenseite umschlossen ist. Ist der Vesikel vollständig in die Zelle aufgenommen, wird das Clathrin abgespalten, wieder zur Zellmembran transportiert und für weitere Aufnahmen zur Verfügung gestellt.

Nanopartikel, bestehend aus D, L-Polylactid (PLA) sowie Poly(ethylen-Glycol-Co-Lactid) (PEG-co-PLA) werden häufig als „Nanocarrier“ für den Wirkstofftransport eingesetzt (Harush-Frenkel *et al.* 2007). Bei der Aufnahme der Partikel sind die Oberflächenladung, sowie der gewählte Zelltyp für den Mechanismus entscheidend. Es konnte gezeigt werden, dass die Partikel, unabhängig ihrer Ladung über Clathrin-abhängige Aufnahmewege in Nierenepithelzellen internalisiert werden konnten (Sahay *et al.* 2010).

Für kationische Silica-Nanotubes (SNT) konnte eine Clathrin-abhängige Internalisierung in Lysosomen von Krebszellen gezeigt werden (Nan *et al.* 2008). Chung *et al.* (2007) zeigten eine Clathrin-abhängige, nicht aber Caveolin-abhängige Aufnahme von Silica-NP in mesenchymalen Stammzellen.

Clathrin- & Caveolin-unabhängige Endozytose:

Die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Aufnahme von Partikeln ist bisher noch relativ wenig untersucht und basiert eher auf einem Ausschlussverfahren. Bisher existieren einige wenige Studien, die die Beteiligung von Interleukin-2-Rezeptoren, Glycosylphosphatidylinositol-gebundenen Proteinen und MHC I vermuten (Lamaze *et al.* 2001; Sabharanjak *et al.* 2002; Naslavsky *et al.* 2004). Welcher Bestandteil genau beteiligt ist, ist abhängig von der Dynamin-Aktivität, sowie speziellen GTPasen, u.a. Cdc42, RhoA oder Arf6 (Mayor & Pagano, 2007; Doherty & McMahon, 2009; Howes *et al.* 2010).

Für die Clathrin- & Caveolin-unabhängige Endozytose gibt es bisher nur wenige Beispiele für Nanomaterialien. Die meisten beschäftigen sich mit NP und Polymeren, die mit Folat modifiziert wurden (Lu & Low 2012).

Für diese funktionalisierten Partikel wird ein komplexer Aufnahmeweg postuliert, der häufig Clathrin- & Caveolin-unabhängig verläuft, allerdings wird für bestimmte Zelltypen auch eine Clathrin-abhängige Endozytose nicht ausgeschlossen (Rijnboutt *et al.* 1996; Doherty & McMahon 2009).

1.5.2. Passiver Membrantransport

Neben der Endozytose ist auch ein passiver Membrantransport für Nanopartikel möglich. Zur Untersuchung dieses Mechanismus wurden verschiedene Studien mit einem Modellsystem von roten Blutzellen (RBC) durchgeführt, da bei diesen keine Phagozytose-Rezeptoren vorhanden sind (Underhill & Ozinsky, 2002). In einer Studie mit unterschiedlichen Partikeln verschiedener Zusammensetzung, Größe und Ladung konnte gezeigt werden, dass bei einer Größe unter 200 nm eine Aufnahme in RBC erfolgte (Rothen-Rutishauser *et al.* 2006). Das Problem des passiven Membrantransports ist, dass sich die Partikel zuerst an die Membran anheften, bevor sie aufgenommen werden. Dabei kann es zu einer Deformierung oder Porenbildung in der Zellmembran kommen (Zhao *et al.* 2011; Li & Malmstadt, 2013). Dabei erfolgt allerdings nicht nur der Eintritt von NP in die Zelle, sondern auch zu ein Austritt zytosolischer Proteine, was zu einer vollständigen Zerstörung der Zelle führen kann. Für CNT konnte gezeigt werden, dass diese in die Zelle diffundieren können, ohne Poren in der Zellmembran zu bilden (Kostarelos *et al.* 2007).

1.6. Toxikologisch relevante Endpunkte, ausgelöst durch NP

Eine Belastung mit NP kann in Zellen verschiedene molekulare Ereignisse auslösen. Diese können, je nach Zelltyp, Art der Partikel sowie gewählter Konzentration zu verschiedenen, pathologisch relevanten Endpunkten führen. Dazu gehören der programmierte (Apoptose), sowie der spontane Zelltod (Nekrose), aber auch Proliferation und Entzündung (Unfried *et al.* 2007). In den nachfolgenden Kapiteln sind verschiedene Mechanismen, ausgelöst durch NP, erläutert, die einen Einfluss auf die Viabilität, sowie das Verhalten der Zelle haben kann.

1.6.1. Zytotoxizität

Angesichts ihrer Größe können NP in verschiedene Zellorganellen vordringen. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass NP mit einem Durchmesser unter 100 nm in die Zelle eindringen können, unter 40 nm sogar in den Nukleus und unter 35 nm sind sie in der Lage, ungehindert die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Oberdörster *et al.* 2004; Dawson *et al.* 2009). Sind sie einmal in die Zelle aufgenommen, können beispielsweise Silica-NP in den Lysosomen und Mitochondrien akkumulieren (Al-Rawi *et al.* 2011) oder im Zytoplasma verbleiben, wie für Silber-NP bereits beschrieben (Singh & Ramarao, 2012). Weitere Partikel, wie SWCNT, können in intrazellulären Vakuolen eingeschlossen vorliegen (Yehia *et al.* 2007). Auch innerhalb der Zelle herrschen unterschiedliche Bedingungen vor, die einen Einfluss auf NP haben können. Die hohe Toxizität für Zinkoxid-NP liegt in der Tatsache begründet, dass sie in die Lysosomen der Zelle aufgenommen werden und dort durch den niedrigeren pH (4-5) dissoziieren können (Xia *et al.* 2008). Die Toxizität dieser Partikel ist somit ein sekundärer Effekt freigesetzter Ionen. Für andere Partikel konnte gezeigt werden, dass diese durch die Protein-Corona leichter in die Zelle aufgenommen werden können, dort allerdings, ebenfalls durch die veränderten Bedingungen, die Protein-Corona wieder entfernt wurde und somit die Partikel innerhalb der Zelle zu toxischen Veränderungen führten (Decuzzi & Ferrari, 2007). Gold-Nanopartikel und CNT zeigen eine direkte Interaktion mit Lysosomen und führen zu einer Permeabilisierung der Lysosomen-Membran, die für die Toxizität der Partikel verantwortlich gemacht wird (Sohaebuddin *et al.* 2010; Tedesco *et al.* 2010).

Die Zytotoxizität eines Stoffes ist generell definiert, als die Fähigkeit, eine lebende Zelle zu schädigen und sie damit in ihrer Viabilität einzuschränken. Dabei ist in erster Linie unerheblich, welche Bestandteile der Zelle dabei geschädigt werden. Die Schädigungen können zu einer verminderten Zellzahl, bzw. verringerten Proliferationsrate, Zerstörung von Organellen oder Einschränkung dieser in ihrer Funktion oder zum Zelltod (nekrotisch oder apoptotisch) führen. Die Aussagen, die man mit einem Zytotoxizitäts-Assay bekommt, sind in der Regel auf einen bestimmten Mechanismus, bzw. eine Funktion der Zelle beschränkt. Dazu gehört zum Beispiel die Intaktheit der Membran, die Funktion der Mitochondrien oder die Lysosomen-Aktivität. Wird aber nur einer dieser Endpunkte untersucht, ist es in der Regel nicht ausreichend, um etwas über die Wirkung der Partikel auf die Zelle auszusagen, da eine Wirkung auf einzelne Organellen nicht zwangsläufig zu einem Absterben der Zelle führen muss.

Ein weiterer Aspekt ist, dass unterschiedliche Zelltypen auch unterschiedliche Reaktionen auf die Belastung mit NP zeigen. In einer Studie wurden die toxischen Effekte von 24 unterschiedlichen NP in zwei unterschiedlichen Zelllinien und die Effekte auf die Lysosomenintegrität und die metabolische Aktivität untersucht. Es zeigten sich nicht nur Unterschiede zwischen den Partikeln, sondern auch zwischen den Zelllinien. Des Weiteren konnte eine höhere Sensitivität in Bezug auf die metabolische Aktivität festgestellt werden (Lanone *et al.* 2009).

In einer Studie von Fotakis & Timbrell (2006) wurden verschiedene Untersuchungen zur Zytotoxizität von Cadmiumchlorid in 2 verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Es wurden sowohl unterschiedliche Konzentrationen, als auch unterschiedliche Zeitpunkte gewählt. Es gab sowohl Unterschiede in den EC₅₀-Werten in Bezug auf die Zelllinie, aber auch in Bezug auf den gewählten Test. In der Publikation kommen die Autoren zu dem Schluss, dass für eine verlässliche Aussage über die zytotoxischen Eigenschaften einer Substanz sowohl mehrere Konzentrationen und Zeitpunkte untersucht werden müssen; ebenso ist es erforderlich, verschiedene Tests durchzuführen, die unterschiedliche Endpunkte betrachten, um eine spezifische Toxizität der Substanz gegen einzelne Organellen (z.B. Mitochondrien oder Lysosomen) auszuschließen (Fotakis & Timbrell, 2006).

In einer Studie von Brunner *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass sowohl schwer lösliche, als auch lösliche Metall-Partikel einen Einfluss auf die Zytotoxizität haben, aber über unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Während die Toxizität der löslichen Partikel hauptsächlich auf die Freisetzung von Metallionen zurückzuführen war, ging man bei den schwer löslichen davon aus, dass diese über endozytotische Mechanismen aufgenommen wurden und in der Zelle akkumulierten (Brunner *et al.* 2006).

Diese Tests sind ein guter Hinweis auf die Toxizität von NP auf biologische Systeme und können deshalb zur Identifizierung erster Anhaltspunkte, bzw. zur Ermittlung einer nicht-toxischen Dosis für weitere Untersuchungen herangezogen werden. Da die meisten Tests jedoch nur auf einen bestimmten Endpunkt abzielen, ist es nicht möglich, Aussagen über mögliche Mechanismen zu treffen, so dass hierzu weitere Tests notwendig sind.

1.6.2. Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Intrazellulärer oxidativer Stress wird allgemein definiert als ein Ungleichgewicht zwischen der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und den biologischen Mechanismen zur Detoxifizierung, sowie Reparatur der resultierenden Schädigungen. Werden durch äußere Einflüsse mehr ROS produziert, oder bricht die antioxidative Abwehr zusammen, kommt es zu intrazellulärem oxidativen Stress.

Um sich selbst vor zu viel oxidativem Stress zu schützen, besitzt die Zelle verschiedene Abwehrmechanismen. Zu den protektiven Mechanismen und detoxifizierenden Enzymen gehören z.B. Hämoxygenase, Glutathion-S-Transferase (GST), NADPH-Oxidase, Katalase, Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (Cho *et al.* 2002; Li *et al.* 2008) und Thioredoxin (Lu & Holmgren 2014).

Oxidativer Stress, welcher durch NP induziert wurde, kann zum einen aufgrund der intrinsischen Eigenschaften der NP selbst verursacht werden, oder durch NP-Zell-Interaktionen (Madl *et al.* 2014). Zur intrazellulären Generierung von ROS können NP mit verschiedenen Zielstrukturen in der Zelle interagieren. Nach einigen Studien existieren drei hypothetische Ziele subzellulärer Strukturen, die von NP beeinflusst werden können. Dazu gehören die Plasmamembran, die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER) (Unfried *et al.* 2007).

Die Generierung von oxidativem Stress durch NP wird als Hauptursache ihrer toxischen Eigenschaften angesehen. NP, welche aus einem Transitionsmetall, oder organischen Kohlenstoff-Verbindungen bestehen, können in einer Fenton- (H_2O_2) oder Haber-Weiss-(OH-Radikale) ähnlichen Reaktion die Bildung von ROS begünstigen (Li *et al.* 2003). Daraus resultierend können stabile, radikale Zwischenstufen an der Oberfläche der NP anhaften und so als intrinsische Quellen für ROS innerhalb der Zelle wirken (Knaapen *et al.* 2004; Li *et al.* 2010; Shvedova *et al.* 2012). In einer Studie wurde gezeigt, dass nicht nur die Zugabe von Antioxidantien, sondern auch die eines Metall-Chelators den NP-induzierten oxidativen Stress reduzieren können (Li *et al.* 2008). Die metallische Komponente der NP scheint somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung pro-oxidativer, sowie pro-inflammatorischer Effekte von NP zu spielen.

Das Problem der umweltinduzierten NP ist, dass sie häufig organische Chemikalien beinhalten, z.B. PAK (Polyaromatische Kohlenwasserstoffe). Zu den PAK gehören unter anderem die Chinone, welche Oxidationsprodukte von Aromaten oder aromatischen Systemen (u.a. PAKs) sind und unter anderem bei Verbrennungsprozessen von Kraftstoffen entstehen. Sie können ebenfalls durch Umsetzung von PAK durch Enzyme, wie Cytochrom P450 oder Epoxid-Hydrolase in der Lunge gebildet werden (Penning *et al.* 1999; Park *et al.* 2006). Chinone reagieren in einer zyklischen Reaktion mit Sauerstoff. Anschließend erfolgt eine oxidative Kopplung mit NADPH oder Eisen zur Bildung von Semichinonen, die zu einer Generierung von Superoxid-Radikalen führt (Squadrito *et al.* 2001). Bei der Verbrennung von Kraftstoffen entstehen häufig Chinone, die sich an die Oberfläche der verbrennungsgenerierten Partikel anlagern und so ebenfalls inhaliert und in die Lunge gelangen können. Diese Komponenten werden für die Induktion von oxidativem Stress in Makrophagen und Epithelzellen verantwortlich gemacht (Li *et al.* 2003). Dieser oxidative Stress ist ausschlaggebend für pro-inflammatorische Effekte, aber auch für Reaktionen im respiratorischen Trakt, die zu unspezifischen, allergischen Prozessen führen können (Li *et al.* 2002).

Wie zuvor bereits erwähnt, gibt es verschiedene zelluläre Organellen, die Quellen für ROS sein können. Mitochondrien sind, aufgrund der Reaktionen der Atmungskette, der Hauptproduzent reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle. ROS werden hierbei während der ATP-Synthese, durch Freisetzung von Elektronen aus den Komplexen I, II und III, gebildet (Jou, 2008). Die Mitochondrien sind aber ebenso häufig Angriffspunkt für oxidative Schädigungen, da schon geringe Störungen des Gleichgewichts zu oxidativem Stress führen können.

Ein vermehrtes Auftreten von ROS und die daraus resultierende Zerstörung der Mitochondrien durch NP-Exposition und das Auftreten von NP im Innern der Mitochondrien exponierter Zellen konnten bereits gezeigt werden (Li *et al.* 2003).

In einer weiteren Studie von 2006 konnte durch die Belastung mit NP ein Ungleichgewicht der Calcium-Ionen-Level gezeigt werden, die auch auf eine Interaktion der NP mit den Mitochondrien und dem ER zurückzuführen ist (Xia *et al.* 2006). In Folge dieser Dysregulation können Calcium-abhängige Enzyme aktiviert werden, die unter anderem für die Entstehung von reaktiven Stickstoffspezies (RNS), wie z.B. Stickstoffoxid (NO) verantwortlich sind. NO kann mit Superoxid zu Peroxonitrit reagieren, welches eine sehr potente, nicht-radikalische oxidierende und nitrierende Spezies ist (Klotz 2002; Klotz & Sies, 2003).

Des Weiteren gibt es Studien, die vermuten lassen, dass ROS-produzierende Mitochondrien eine Aktivierung des Inflammasoms in phagozytierenden Zellen verursachen. Somit scheint es einen Zusammenhang zwischen mitochondriellem oxidativen Stress und einer Entzündungsreaktion zu geben (Zhou *et al.* 2003; Shvedova *et al.* 2012).

Eine Überlastung des oxidativen Systems kann aber auch zu weiteren Schädigungen z.B. an Lipiden, Proteinen und DNA führen (Schins *et al.* 2002). Auch in Tierversuchen konnten adverse Effekte beobachtet werden, die durch NP-induzierten oxidativen Stress generiert wurden. So zeigten Sharma *et al.* (2012) in einem Versuch mit oral applizierten Zinkoxid-NP in Mäusen, dass höhere Dosen der NP in der Leber akkumulieren und oxidativen Stress verursachen, der zu DNA-Schädigungen und einer gesteigerten Apoptoserate führt.

Eine Überlastung des oxidativen Systems muss nicht zwangsläufig zu einer Zerstörung der Zellen führen. ROS können ebenfalls als „*second messenger*“ agieren (Abdelmohsen *et al.* 2003) und so verschiedene Signalwege aktivieren (Barthel & Klotz, 2005), zum Beispiel solche, die Inflammation, Proliferation und programmierten Zelltod regulieren (Weissenberg *et al.* 2010).

Obwohl starker oxidativer Stress zu pathologischen Dysfunktionen der Zelle, sowie Apoptose und Nekrose führen kann, besteht die Vermutung, dass milder oxidativer Stress als eine Art protektive Vorbehandlung gegen einen schweren Angriff mit ROS wirken kann (Jou, 2008).

1.6.3. Partikelinduzierte Signaltransduktion

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass NP nicht nur in der Lage sind, in lebende Zellen aufgenommen zu werden, sondern auch zelluläre Signalwege aktivieren können. Wie bereits oben erwähnt, sind NP in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, welche als „*second messenger*“ agieren können und so verschiedene zelluläre Signalwege aktivieren. So konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Signalwege durch vermehrte Generierung von ROS aktiviert werden und zu Lungenerkrankungen führen können (Kisseleva & Brenner 2008). Für CNT beispielsweise wurde gezeigt, dass diese intrazellulär oxidativen Stress verursachen können, welcher zu DNA-Schädigungen aber auch abnormalem Zellwachstum führen kann. Diese können im weiteren Verlauf zu Kanzerogenese und Fibrose führen (Jaurand 1997; Jaurand *et al.* 2009). Durch Nanopartikel können Stressreaktionen in der Zelle ausgelöst werden, die nicht in schweren Schäden enden, aber zu Veränderungen z.B. in der Gewebemöostase und Induktion von pro-inflammatorischen Reaktionen führen (Unfried *et al.* 2007). Für Nanopartikel aus Silica und Kohlenstoff wurde bereits gezeigt, dass diese Dosis- und größenabhängig Apoptose und Proliferation in Lungenepithelzellen induzieren (Tamaoki *et al.* 2004; Sydlik *et al.* 2006).

NP können in Konzentrationen, die keine zytotoxischen Effekte hervorrufen, zur Induktion der Signaltransduktion beitragen (Sydlik *et al.* 2006). Die Art der Interaktion wird dabei bestimmt durch die Größe, Oberfläche, sowie Protein-Corona der Partikel (Nel *et al.* 2009; Albanese *et al.* 2012) und kann sowohl von biologischer, als auch toxikologischer Relevanz sein.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass CNP in Epithelzellen zu einer erhöhten Zellproliferation führen, die über eine Aktivierung des EGFR (*epidermal growth factor receptor* = Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), sowie über β 1-Integrine verlaufen (Unfried *et al.* 2008). Integrine sind Transmembranproteine, die für die Zelladhäsion, sowie die Kommunikation zwischen den Zellen und ihrer Umgebung verantwortlich sind. Sie sind ebenso wichtige Bestandteile zellulärer Signalwege. Eine Aktivierung kann zu Angiogenese, Migration sowie Differenzierung führen (Calderwood, 2004; Harburger *et al.* 2009).

Der EGFR ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Er wird unter anderem durch die Bindung des Liganden EGF (*epidermal growth factor* = epidermaler Wachstumsfaktor) aktiviert, kann allerdings auch durch reaktive Sauerstoffspezies über verschiedene Mechanismen aktiviert werden (Fickova, 2002; Abdelmohsen *et al.* 2003).

Die Aktivierung des EGFR wird als Schlüssel-Ereignis der Aktivierung von MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) angesehen (Peuschel *et al.* 2012). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer Aktivierung des Rezeptors führen, sind allerdings bislang nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist bisher, dass sich der EGFR in Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Domänen befindet, die *Lipid rafts* genannt werden. Diese Lipid rafts sind spezielle Signalplattformen, die bei einer Rezeptoraktivierung ihre Konformation und Zusammensetzung ändern können (Hofmann *et al.* 2008). Ein verringerter Gehalt an EGFR in den Fraktionen der *Lipid rafts* durch Belastung mit CNP konnte bereits gezeigt werden (Peuschel *et al.* 2012). Dies ist vermutlich auf eine Internalisierung des Rezeptors zurückzuführen. Der Mechanismus der Internalisierung scheint jedoch abhängig zu sein von der Art der Rezeptor-Aktivierung. Wird der EGFR durch den Liganden EGF aktiviert, findet eine Internalisierung des Rezeptors in so genannte Clathrin-coated pits statt und der Rezeptor wird in Endosomen zu den Lysosomen transportiert. Dort kann er entweder abgebaut werden, oder recycelt und zurück zur Plasmamembran transportiert werden (Dikic 2003).

Auch durch ROS kann der EGFR aktiviert werden und in den perinukleären Raum translokieren. Eine ROS-abhängige Aktivierung des EGFR und Translokation wurde bereits mit einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 in Zusammenhang gebracht (Ravid *et al.* 2004).

In einer Studie von Khan *et al.* 2006 wurde eine Clathrin-unabhängige Aktivierung des EGFR durch ROS gezeigt. Dabei vermuten die Autoren, dass es hierbei zu einer Caveolin-abhängigen Internalisierung des EGFR kommt, die nicht zu einer Degradation des Rezeptors führt, sondern dieser in einer aktiven Form im Innern der Zelle verbleibt. Die Hypothese ist, dass der Mechanismus dieser Caveolin-abhängigen Internalisierung des EGFR auf eine ROS-abhängige Aktivierung von SFK (*src family kinases*) zurückzuführen ist.

Welcher Endpunkt durch die Belastung mit NP ausgelöst wird, hängt sowohl von der Aktivierung der Membranrezeptoren, als auch von den MAPK ab. Die Aktivierung des EGFR kann zur Einleitung der intrinsisch ablaufenden Apoptose führen, wenn der downstream-Signalweg über die Phosphorylierung von JNK1/2 (Jun-N-terminale Kinasen) abläuft. Wird über den EGFR allerdings der Signalweg über die Aktivierung von ERK1/2 (Extrazellulär regulierte Kinasen) induziert, führt dies zur Replikation und Teilung der Zelle (Sydlik *et al.* 2006). Da beide Signalwege vom EGFR induziert werden, muss zwischen der Rezeptor- und der MAPK-Aktivierung ein weiterer Zwischenschritt erfolgen, der entscheidet, welcher Signalweg induziert wird und welcher Endpunkt erreicht wird.

Eine Möglichkeit ist die parallele Aktivierung von Integrinen, für die ebenfalls gezeigt werden konnte, dass sie bei der Rezeptor-vermittelten Induktion der Proliferation auch die Aktivierung von Integrinen eine entscheidende Rolle spielt (Moro *et al.* 1998).

In weiteren Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die ERK1/2-Aktivierung von den SFK (*src family kinases*) abhängig ist (Peuschel *et al.* 2012). SFK sind entscheidend bei der Aktivierung membranabhängiger Signalprozesse, wie Proliferation, Migration und Zellviabilität (Parsons & Parsons, 2004). SFK gehören zur Familie der Tyrosinkinase und sind Bestandteil membranabhängiger Signaltransduktions-Prozesse. Die Aktivierung erfolgt durch Dephosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr527 und durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr416 (Brown & Cooper, 1996).

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die neutrophile Entzündung der Lunge in einem Mausmodell, ausgelöst durch CNP, einhergeht mit einer verstärkten Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 (Sydlik *et al.* 2009). Durch Vorbehandlung mit dem kompatiblen Solut Ectoin konnte die neutrophile Entzündung reduziert werden. In einer darauf aufbauenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit Firoin zu einem protektiven Effekt gegenüber neutrophiler Entzündung in der Lunge, sowie verringerter Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, sowie JNK1/2 führt (Autengruber *et al.* 2014).

1.7. Motivation

Aus den Vorergebnissen der Arbeitsgruppe sind molekulare Signalwege für die Belastung mit CNP identifiziert worden, die spezifisch zur Aktivierung der pathogenen Endpunkte Proliferation, Inflammation und Apoptose führen können. Als spezifische Marker haben sich dabei die MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 als repräsentativ herausgestellt (Sydlik *et al.* 2006; Sydlik *et al.* 2009). Des Weiteren konnte bereits in weiteren *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Signalwege spezifisch durch CNP aktiviert werden, größere Kohlenstoff-Partikel haben diese Reaktionen nicht ausgelöst (Peuschel *et al.* 2012). Darüber hinaus konnte die Relevanz für unterschiedliche epitheliale Zelllinien (Peuschel *et al.* 2010) bestätigt werden.

Erste Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe im *in vitro* Zellkulturmodell geben Hinweise darauf, dass die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 auch für weitere Nanomaterialien, wie Siliziumdioxid und Titandioxid, relevant ist (Abbildung 1.2).

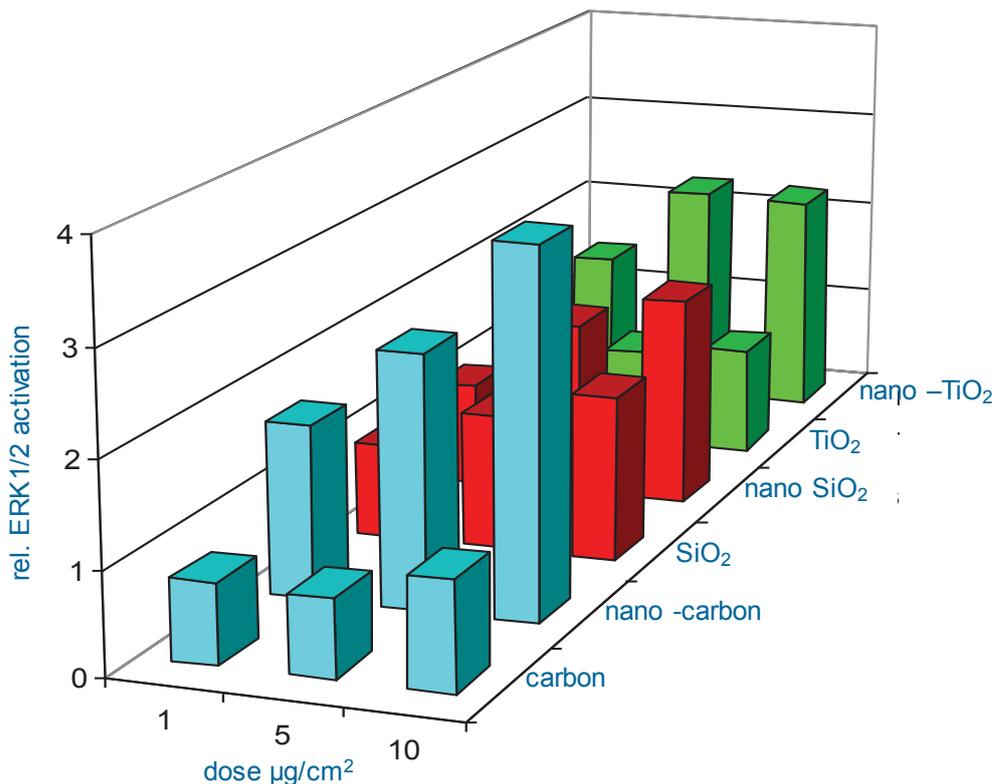


Abb. 1.2 Dosisabhängige Aktivierung von phospho-ERK1/2 in RLE-Zellen: RLE-Zellen wurden für 8 Stunden mit 1, 5 und 10 µg/cm² der angegebenen Partikeln belastet. Die Proteine wurden aus den Zellen isoliert und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Angegeben sind die relativen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 1.2 ist die Aktivierung der MAPK ERK1/2 nach 8 Stunden Partikelbelastung in Lungenepithelzellen aus Western-Blot Analysen dargestellt. Für die verwendeten NP, CNP, nano-SiO₂ und nano-TiO₂ ist eine dosisabhängige Phosphorylierung erkennbar. Für die nicht-NP CP und TiO₂ ist kein Anstieg sichtbar. Als Positivkontrolle wurde Quarz (SiO₂) verwendet, der ebenfalls zu einer dosisabhängigen Aktivierung der MAPK führt, die allerdings nicht vergleichbar hoch ausfällt, wie durch die NP ausgelöst.

In der nachfolgenden Arbeit sollte die Relevanz der Aktivierung der MAPK des *in vitro* Systems, basierend auf Ratten-Lungenepithelzellen in einem *in vivo* System untersucht werden. Aus weiteren Vorversuchen der Arbeitsgruppe aus der BAL (bronchoalveolaren Lavage) ist bekannt, dass eine Belastung von C57BL/6-Mäusen mit 2,5 mg/kg Körpergewicht der gezeigten Partikel innerhalb von 6 Stunden keine Entzündungsreaktion auslöst (Abbildung 1.3). Somit kann eine Einwanderung von Entzündungszellen und eine inflammatorische Reaktion zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden.

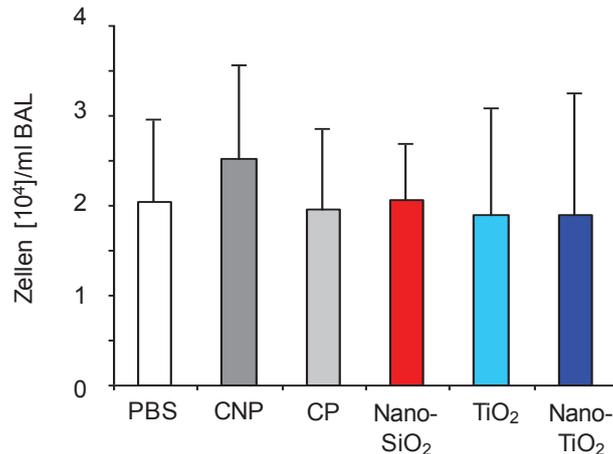


Abb. 1.3 Gesamtzellzahl der bronchoalveolaren Lavage von Mäuselungen: C57BL/6-Mäuse wurden für 6 Stunden mit den angegebenen Partikeln instilliert. Die Lunge wurde 4x mit 1 ml PBS gespült und die Gesamtzellzahl bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 Tieren pro Behandlungsgruppe.

In den Lungenhomogenaten der behandelten Tiere wurde in Western-Blot-Analysen die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 untersucht und eine Verstärkung durch die NP festgestellt (Abbildung 1.4). Die Stärke der gezeigten Aktivierung, ausgelöst durch die NP, ist vergleichbar mit der zuvor gezeigten *in vitro* Situation (vgl. Abb. 1.2). Die Kenntnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen, sowie der Vorversuche aus dem Tierversuch bilden die Basis der vorliegenden Arbeit.

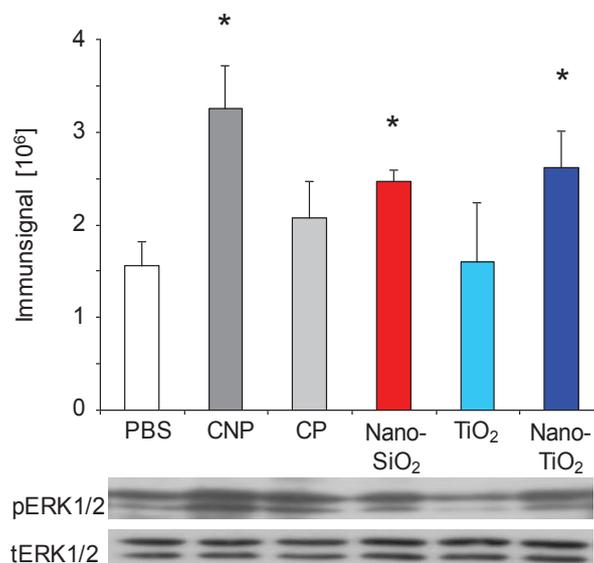


Abb. 1.4 Aktivierung von phospho-ERK1/2 im Lungenhomogenat: C57BL/6-Mäuse wurden für 6 Stunden mit den angegebenen Partikeln instilliert. Die Lunge wurde entnommen, die Proteine aus dem Lungenhomogenat isoliert und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 Tieren pro Behandlungsgruppe. * = Student's T-Test ($p < 0,05$)

Zur Untersuchung der Relevanz des *in vitro* Systems, basierend auf epithelialen Lungenzellen, werden Gefrierschnitte von Lungen belasteter Mäuse mit spezifischen Antikörpern der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 zur immunfluoreszierenden Darstellung gefärbt und repräsentative alveolare Bereiche der Lungen ausgewählt, um die Epithelzell-spezifische Färbung darzustellen.

Zur Identifizierung der Relevanz der o.g. Signalwege für weitere, Metall-haltige NP sollte eine Mikroskopie-basierte Methode entwickelt werden, die die Quantifizierung immunfluoreszierender Färbungen der MAPK in einem *in vitro*-System ermöglicht. Des Weiteren werden mit der Methode mechanistische Untersuchungen der Partikel-induzierten Signalwege durchgeführt. Hierzu werden Partikel unterschiedlicher Größe und chemischer Zusammensetzung, bestehend aus Kohlenstoff, Siliziumdioxid und Titandioxid verwendet.

Bereits in voraus gegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies durch NP einen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Signalwege hat (Sydlik *et al.* 2006; Peuschel *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Redox-Aktivität von NP, bzw. ihre Fähigkeit, als Katalysator der Fenton-Reaktion zu agieren, die Menge an auftretenden ROS erhöhen können (Weissenberg *et al.* 2010). Um die Relevanz der Redox-Aktivität, sowie intrazellulär generierten ROS durch NP, bzw. deren Einfluss auf die Aktivierung MAPK-spezifischer Signalwege gezielt zu untersuchen, wird ein Set von NP gewählt, welche eine metallische Komponente beinhaltet, die aus dem Transitionsmetall Mangan besteht.

Darüber hinaus ist es möglich, verschiedene Formen dieser NP mit unterschiedlichen Oxidationsstufen zu synthetisieren, so dass zusätzlich der Einfluss der Partikelform (nano, nicht-nano, Stäbchen-förmig), sowie der Oxidationsstufe (Mn_3O_4 ; MnO_2). auf die Induktion MAPK-spezifischer Signalwege untersucht werden kann.

1.8. Ziele der Arbeit

Basierend auf den Erkenntnissen zu den molekularen Signalwegen, ausgelöst durch Kohlenstoff-Nanopartikel, sowie auf den ersten Befunden mit industriell hergestellten NP, sollte die Relevanz dieser Signalwege für moderne Nanomaterialien vertieft untersucht werden. Folgende Ziele sollten erreicht werden:

1. Validierung der bestehenden in vitro Marker in einem in vivo System zur Identifizierung der pathogenen Endpunkte Proliferation, Apoptose und Entzündung
2. Etablierung einer Mediumdurchsatz-Methode zur Identifizierung toxikologisch relevanter Endpunkte in einem in vitro System
3. Identifizierung molekularer Signalereignisse für industriell hergestellte Nanomaterialien

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Geräte

Autoklav, Tecnoclav	Integra Biosciences
Binokular, Leitz	Leica Microsystems
Brutschrank für Zellkulturen (HERAcell 240)	Thermo Scientific
Cellomics HCS Reader	Thermo Scientific
Cryostat Leica CM 3050S	Leica Biosystems
ELISA-Reader Multiskan Ascent 96	Labsystems Inc.
FACScalibur Flow Cytometer	BD Bioscience
Fluoroskan Ascent	Labsystems Inc.
Gelkammern Dual gel vertical unit	Sigma-Aldrich
Heizblock Bioblock Scientific	Thermolyne Corp.
Horizontal-Wasserbadschüttler	Infors AG
Kühlschränke	Liebherr, Bulle
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf AG
Mikroskope	
Zeiss	Carl Zeiss AG
Leitz Laborlux K	Leica Microsystems
Multipette® Plus	Eppendorf AG
Photometer	
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte
Rasterelektronenmikroskop	
Thermal-field-emission scanning Elektron-	
Mikroskop FE SEM; Jeol JSM-7000F	Jeol Ltd.
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments
Spannungsgeber	
EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals
GPS 200/400	Pharmacia Fine Chemicals
Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories

Microplate reader Infinite F200	Tecan Group Ltd.
Western Blot Transferkammer	
Criterion™-Blotter	Bio-Rad Laboratories
Ultraschallbad, Bransonic 220	Branson
Waagen	
Mettler PC 440, DeltaRange	Mettler-Toledo
Sartorius 1602 MP	Sartorius
Zentrifugen	
Eppendorf-Zentrifuge 5414 C	Eppendorf AG
Sigma 3K30	B. Braun Biotech International
Mikro 200	Hettich
Zetasizer	Microtrac's Zetatrac

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

AcroCap™ Filter Unit	Pall
Deckgläser (22x22 cm)	Carl Roth GmbH & Co. KG
(24x60 cm)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf AG
Falcon (15 ml)	BD Bioscience
Falcon (50 ml)	BD Bioscience
Filterpapier	Schleicher & Schuell BioScience,
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent
PAP-Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Parafilm	Pechiney
Pipetten	Greiner bio-one
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran	
Hybond®-P	GE Healthcare
Reaktionsgefäße für FACS-Analysen (5 ml)	BD Bioscience
Röntgenfilme SuperRX	Fuji
SuperFrost Plus Objektträger	Thermo Scientific
Tissue-Tek Cryomold (15x15x5 mm)	Sakura Finetek
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One

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

2.1.3. Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Pharmacia Biotech
Amphotericin B	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H ₂ DCF-DA)	Calbiochem, Merck Millipore
Dihydroethidium (DHE)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
EosinY-Lösung	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Fotochemikalien (GBX Entwickler und Fixierer)	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hämatoxylinlösung	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin QS	Vector Laboratories Inc.
Hank's Buffered Saline Solution +Ca ²⁺ /+Mg ²⁺ (HBSS+/+)	GIBCO Invitrogen
Immersionsöl	Merck KGaA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ketavet (100 mg/ml)	Pfizer Inc.
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
MitoSox Red	Invitrogen Ltd.

Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA
Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (rauchend)	Sigma-Aldrich
Streptomycin	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI	Cell Signaling Technology
Rompun (23 mg/ml)	Bayer AG
Signal Stain Boost IHC Detection Reagent	Cell Signaling Technology
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypsin-EDTA Solution 10x	Sigma-Aldrich
TX-100 (Triton)	Sigma-Aldrich
Vectamount Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories Inc.
Wasserstoffperoxid-Lösung 30% (v/v)	Merck KGaA
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ziegennormalserum (ZNS)	abcam

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

2.1.4. Lösungen

EDTA (0,5 M)

93,05 g Na₂EDTA x 2H₂O
500 ml H₂O

20x Tris-buffered Saline (TBS):

48,8 g Tris
160 g NaCl
Ad. 1000 ml
pH 7,6

Protein-Probenpuffer

0,06 M Tris-HCl (pH 6,8)
1% (w/v) SDS
10% (w/v) Saccharose
0,5% (v/v) β-Mercaptoethanol
0,05% (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer für Gelelektrophorese

0,05 M Tris
0,384 M Glycin
0,1% (w/v) SDS

Laufpuffer für Western-Blot-Transfer

15,15 g Tris
72 g Glycin
Ad 1000 ml

Stammlösung zur Narkotisierung

4,1 ml PBS
0,5 ml Ketavet
0,4 ml Rompun

RLE-6TN Nährmedium:

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

Serumreduziertes Medium:

500 ml	Nutrient Mixture F-12 Ham bzw. Minimal Essential Medium
2 mM	L-Glutamin
0,5 % (v/v)	fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert
50 U/ml	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycin
2,5 µg/ml	Amphotericin B

RIPA-Puffer:

25 mM	Tris/HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
0,1 mM	EDTA, pH 8,0
1% (w/v)	Nonidet P-40 (Igepal CA-630)
1% (w/v)	Desoxycholsäure-Natriumsalz
0,1% (w/v)	SDS
0,025% (w/v)	NaN ₃
1% (v/v)	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
1% (v/v)	Protease Inhibitor Cocktail

Polyacrylamid-Gele zur Protein-ElektrophoreseTrenngel:

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

Sammelgel:

3% (v/v) Rotiphorese Gel 30

60 mM TrisHCl, pH 6,8

0,1% (w/v) SDS

0,05% (w/v) APS

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

Laufpuffer für Gelelektrophoresen

50 mM Tris

384 mM Glycin

0,1% (w/v) SDS

Elektrophorese-Probenpuffer:

120 mM Tris/HCl, pH 6,8

2% (w/v) SDS

20% (w/v) Saccharose

1% (v/v) β-Mercaptoethanol

0,1% (w/v) Bromphenolblau

Transferpuffer (pH 8,3) für Western Blot:

25 mM Tris

192 mM Glycin

10% (v/v) Methanol

TBST (Tris-gepufferte Saline mit Tween 20):

20 mM TrisHCl, pH 7,6 137 mM NaCl

0,1% (w/v) Tween 20

2.1.5. Inhibitoren und Antioxidantien

Cytochalasin D	Sigma-Aldrich
Erlotinib	Santa Cruz Biotech
Filipin	Sigma-Aldrich
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich
PD96059	New England Biolabs GmbH
Tocopherol (Vitamin E)	Sigma-Aldrich

2.1.6. Antikörper

2.1.6.1. Primäre Antikörper

2.1.6.1.1. Antikörper für Western Blot

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>verwendete Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen, monoklonal	1:2000	Cell Signaling
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Kaninchen, monoklonal	1:2000	Cell Signaling
GAPDH	Maus, monoklonal	1:10.000	Cell Signaling
Phospho-c-Jun	Kaninchen, monoklonal	1:2000	Cell Signaling

Alle Antikörper wurden in 5% BSA/TBST verdünnt.

2.1.6.1.2. Antikörper für Immunfluoreszenz *in vivo*

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>verwendete Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen, polyklonal	1:100	Santa Cruz Biotech.
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) XP	Kaninchen, monoklonal	1:50	Cell Signaling
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen, polyklonal	1:50	Cell Signaling
SPC (<i>surfactant protein C</i>)	Kaninchen, polyclonal	1:50	abcam

Alle Antikörper wurden in 5% ZNS/TBS verdünnt.

2.1.6.1.3. Antikörper für Immunfluoreszenz *in vitro*

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Phospho-Akt (Ser 473) XP	Kaninchen, polyklonal	1:50	Cell Signaling
EGFR	Kaninchen, polyklonal	1:50	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) XP	Kaninchen, monoklonal	1:100	Cell Signaling
p44/42 MAPK	Kaninchen, monoklonal	1:100	Cell Signaling
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) XP	Kaninchen, monoklonal	1:50	Cell Signaling

Phospho-SAPK/JNK

(Thr183/Tyr185)

Maus, monoklonal

1:50

Cell Signaling

Alle Antikörper wurden in 1% ZNS in PBS verdünnt.

2.1.6.2. Sekundäre Antikörper**2.1.6.2.1. HRP-markierte Antikörper**

- Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin G (IgG) Meerrettich-Peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich).

- Ziege-Anti-Maus Immunglobulin G (IgG) Meerrettich-Peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich).

Eingesetzt wurden beide Antikörper entsprechend dem ersten Antikörper 1:2000 in 5% BSA/TBST verdünnt.

2.1.6.2.2. Fluoreszenz-markierte Antikörper

- Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin G (IgG) AlexaFluor 594 (Cell Signaling).

- Ziege-Anti-Maus Immunglobulin G (IgG) AlexaFluor 488 (Cell Signaling).

Eingesetzt wurden beide Antikörper entsprechend dem ersten Antikörper 1:800 in 1% ZNS/PBS verdünnt.

2.1.7. Modellpartikel-System

2.1.7.1. Kohlenstoff

Ultrafeines Carbon Black: Bei diesen Partikeln handelt es sich um das Markenprodukt Printex® 90 der Firma Degussa (Frankfurt/Main), mit einem primären Partikeldurchmesser von 14 nm. Die frisch eingewogenen Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert.

Feiner Kohlenstoff: Bei diesen Partikeln handelt es sich um das Markenprodukt Huber 990 der Firma H. Haeffner (Chepstow, UK), mit einem primären Partikeldurchmesser von 260 nm. Die frisch eingewogenen Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert.

2.1.7.2. Siliziumdioxid

Ultrafeines Silica (fumed): Bei diesen Partikeln handelt es sich um das Markenprodukt der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) mit einem primären Partikeldurchmesser von 14 nm. Die frisch eingewogenen Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert.

Feines Silica (amorph): Bei diesen Partikeln handelt es sich um das Markenprodukt der Firma Corpuscular Inc. (Cold Spring NY, USA) mit einem primären Partikeldurchmesser von 280 nm. Die Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert.

2.1.7.3. Titandioxid

Ultrafeines Titandioxid: Bei diesen Partikeln handelt es sich um das Markenprodukt der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) mit einem primären Partikeldurchmesser von 50 nm. Die frisch eingewogenen Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert.

Feines Titandioxid: Bei diesen Partikeln handelt es sich um das Markenprodukt der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) mit einem primären Partikeldurchmesser von 250 nm. Die frisch eingewogenen Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert.

In Tabelle 2.1 sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Modellpartikel, sowie die im Weiteren verwendeten Abkürzungen, dargestellt.

Tab. 2.1 Eigenschaften der verwendeten Modell-Partikel

Name	Verwendete Abkürzung	Chemische Zusammensetzung	Primärer Partikeldurchmesser [nm]	Oberfläche [m²/g]
Kohlenstoff Nanopartikel	CNP	C	14	300
Kohlenstoff Partikel	CP	C	260	8
Nano Silica	Nano-SiO₂	SiO ₂	14	200
Nicht-nano Silica	SiO₂	SiO ₂	250	-
Nano Titandioxid	Nano-TiO₂	TiO ₂	50	50
Nicht-nano Titandioxid	TiO₂	TiO ₂	250	10

2.1.7.4. Manganoxid (Mn₃O₄/MnO₂)

Mangan-Nanopartikel: Die Partikel wurden in der AG Gotić (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Kroatien) synthetisiert (vgl. 2.2.1). Der Durchmesser der Partikel beträgt, je nach Form, zwischen 20 und 300 nm (s. Abb. 3.24). Die frisch eingewogenen Partikel wurden unmittelbar vor jeder Belastung der Zellen als 1 mg/ml Suspension in PBS angesetzt, und für 1 h im Ultraschallbad mit 50 – 60 kHz, 120 V dispergiert. Zum besseren Verständnis werden die Partikel mit den Bezeichnungen Mangan-1 (Mn1) bis Mangan-4 (Mn4) versehen.

2.1.8. Zelllinie

RLE-6TN:

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

2.1.9. Versuchstiere

Für die nachfolgenden Versuche wurden weibliche Mäuse vom Stamm C57BL/6JRj der Firma Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, Frankreich) verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Lieferung 8 Wochen alt und wurden nach einer Akklimatisierungszeit von 1 Woche für die nachfolgenden Versuche verwendet.

2.1.10. Software

Ascent Software	Thermo Scientific
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG
Cellomics Scan	Thermo Scientific
Cellomics View	Thermo Scientific
CellQuest 3.3	BD BioScience
FlowJo	FlowJo LLC
ImageJ	Wayne Rasband
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation
Microsoft Powerpoint 2013	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation
SPSS 21.0	IBM

2.2. Methoden

2.2.1. Partikelsynthese

2.2.1.1. Hausmannit (Mn_3O_4)

Eine 2 molare Lösung von Manganchlorid (MnCl_2) wurde bei Raumtemperatur tropfenweise mit 5 ml konz. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unter ständigem Rühren versetzt. Anschließend wurden 5 ml konz. Ammoniak ebenfalls tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde für 24 h bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde das erhaltene Fällungsprodukt mit Wasser gewaschen und bei 60°C getrocknet.

2.2.1.2. Mangandioxid (MnO_2)

0,128 g Kaliumpermanganat wurden in Wasser gelöst und mit einer Manganchlorid-Lösung versetzt. 1 ml rauchende Salzsäure wurde zugegeben und mit Wasser auf 45 ml aufgefüllt und auf einen pH von 2 eingestellt. Die Lösung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und für 3 bzw. 12 Stunden bei 70 bzw. 100°C erhitzt. Das erhaltene Fällungsprodukt wurde mit Wasser gewaschen und bei 60°C getrocknet.

2.2.2. Charakterisierung der Mangan-Partikel

Die Charakterisierung der Mangan-Partikel erfolgte im Rahmen des Projekts der vorausgegangenen Master-Arbeit. Dazu wurden die Mangan-Partikel abgewogen und die entsprechenden Konzentrationen in PBS angesetzt. Eine Konzentration von $16,5 \mu\text{g/ml}$ der Suspension entsprach hierbei einer Belastung der Zellen mit $5 \mu\text{g/cm}^2$. Die Verdünnungen wurden 1h Stunde im Ultraschallbad inkubiert. Zeigte der Loading Index einen Wert $< 0,01$, wurde der Blindwert durch Messung von ca. 1 ml PBS festgesetzt. Anschließend wurde die Messung mittels DLS (Dynamic Light scattering) gestartet. Für jede Probe wurden 5 Messungen durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

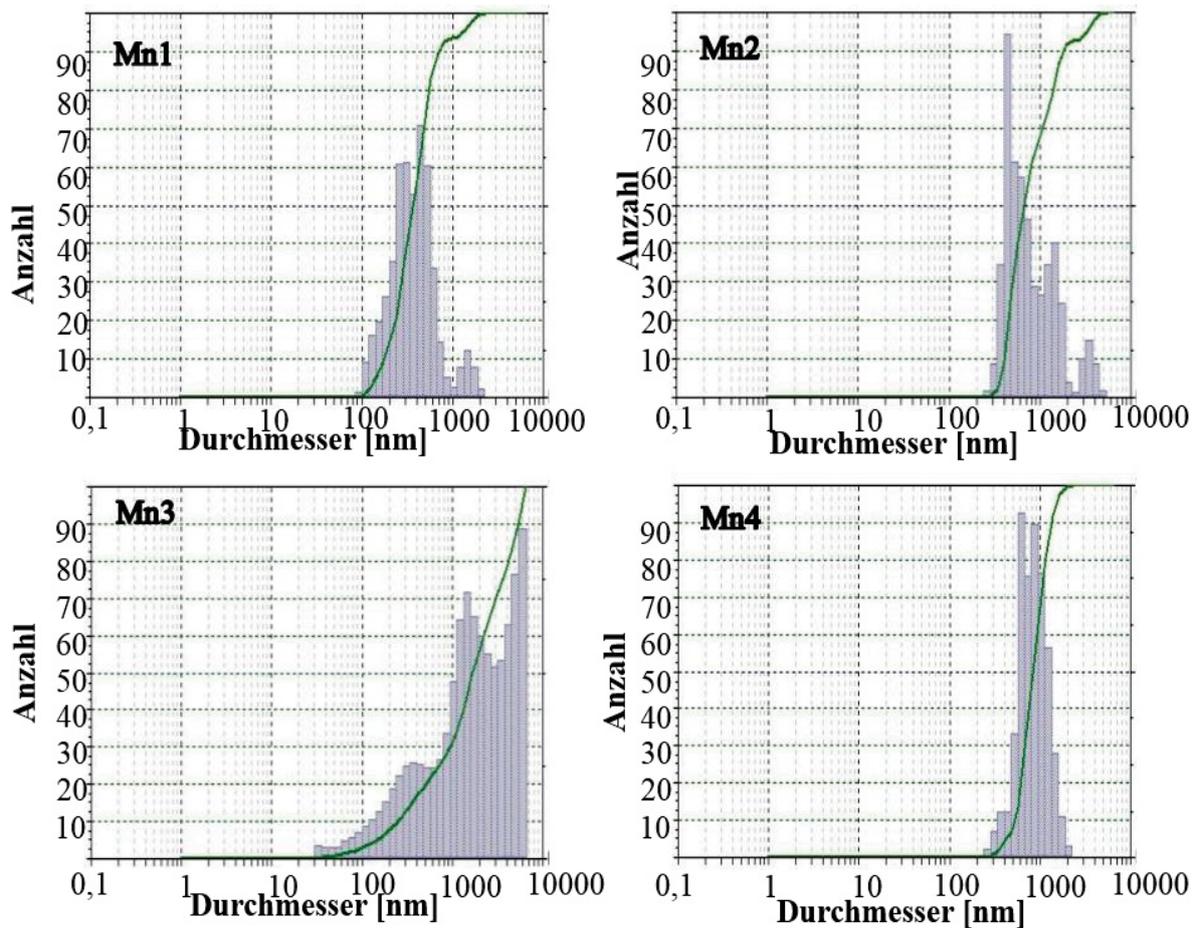


Abb. 2.1 Darstellung der Größenverteilung der Partikelagglomerate in PBS: Die Partikel wurden in einer Konzentration von $16 \mu\text{g/ml}$ angesetzt, die im Zellkultur-Versuch einer Konzentration von $5 \mu\text{g/cm}^2$ entspricht. Die Suspensionen wurden in 5fach-Bestimmung mit DLS gemessen.

Die physikalischen Eigenschaften der Partikelsuspensionen sind in Tabelle 2.2 angegeben. Das Zetapotential unterscheidet sich für die 4 Partikel sehr stark voneinander. Für Mn1 und Mn4 liegt es knapp unter 4 mV , für Mn2 beträgt es knapp 23 mV . Im Gegensatz dazu besitzt die Suspension mit Mn3 ein stark negatives Zetapotential von nahezu -1400 mV .

Ebenso unterschiedlich verhalten sich die Agglomerate in den Suspensionen. Für Mn1 besitzt der größte Teil eine Größe von 263 nm (53%), der zweitgrößte Teil 506 nm (40%). Nur ein sehr geringer Teil von 6% bildet erheblich größere Aggregate von 1500 nm. Für Mn2 sind mehr als 70% der Partikel 536 nm groß. Ein viertel lagert sich zu Agglomeraten von fast 1500 nm zusammen und nur ein sehr geringer Teil bildet größere Verbände von mehr als 3500 nm. Mn4 bildet 2 unterschiedlich große Agglomerate von nahezu gleicher Verteilung, von 1043 nm (57%) und 627 nm (43%). Mn3, als nicht-Nanopartikel lagert sich zu 1163 nm (70%) bzw. 4840 nm (29%) großen Partikelverbänden zusammen.

Tab 2.2: Physikalische Eigenschaften der Partikelsuspensionen: Partikel wurden mit PBS in einer Konzentration von 16 µg/ml angesetzt und mittels Zetasizer das Zetapotential, sowie der hydrodynamische Durchmesser der Partikel gemessen.

	Zetapotential [mV]	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]
Mn1	3,86	1516 (6,2%) 506 (40,2%) 263,4 (53,6%)
Mn2	22,81	3570 (7,3%) 1457 (22,2%) 536 (70,5%)
Mn3	-1386,86	4840 (29,4%) 1163 (70,6%)
Mn4	3,73	1043 (56,7%) 627 (43,3%)

2.2.3. Zellkultur

2.2.3.1. Kultivierung der Zelllinie RLE-6TN

RLE-6TN Zellen wurden als Monolayer-Kultur in RLE-6TN Nährmedium auf Gewebekulturflaschen bei 37°C, 5% [v/v] CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel fand alle 2-3 Tage mit auf 37°C vorgewärmtem Medium statt. Die Zellen wurden wöchentlich nach Erreichen 80-90%iger Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgegossen, die Zellen 1x mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für ca. 30 Sekunden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt.

Nach Abgießen der überschüssigen Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen für 3-5 min im Brutschrank inkubiert. Dabei musste ein zu langer Kontakt der Zellen mit der Lösung vermieden werden, da längere Einwirkzeiten die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel herabsetzen. Durch zusätzliches Klopfen sollten die Zellen möglichst vollständig vom Flaschenboden gelöst werden. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Medium inaktiviert, die Zellen vom Flaschenboden gespült, in Falcons aufgenommen, resuspendiert und 9 min mit 100 x g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und nach einer Zellzählung mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^4$ Zellen/ml in einer Gewebekulturflasche in einem Endvolumen von 20 ml ausgesät.

2.2.3.2. Kultivierung der Zelllinie RLE-6TN für Versuche

Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen in 6-Well-Plastikplatten (9,6 cm² pro Well) oder 96-Well Plastikplatten (0,32 cm² pro Well) mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² ausplattiert und für ca. 20 h bis zu einer Konfluenz von 80 - 90% in 3 ml bzw. 100 µl Nährmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für weitere 24 h in 3 ml bzw. 100 µl serumreduziertem Medium gehalten. Anschließend erfolgte die Partikelzugabe.

2.2.4. Versuchstiere

2.2.4.1. Versuchstierhaltung

8 Wochen alte, weibliche Mäuse vom Stamm C57BL/6JR wurden unter SPF-Bedingungen in klimatisierten Räumlichkeiten des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung gehalten. Mit Hilfe einer automatisierten Lichtregulation, die auf einen 12-Stunden-Takt eingestellt war, wurde der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere eingestellt. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser und Futter und wurden maximal zu fünf in einem ausreichend großen Käfig untergebracht. Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche wurde der Tierversuch entsprechend des Tierschutzgesetzes, nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes NRW (LANUV-NRW), durchgeführt.

2.2.4.2. Behandlung der Versuchstiere

Die Tiere wurden mit 5% Isofluran 2 Minuten lang narkotisiert. Nach ausreichender Betäubung wurde den Tieren ein Volumen von 50 µl der zuvor angesetzten Partikelsuspensionen mittels pharyngealer Aspiration appliziert. Bis zum Wiedererwachen des Tieres wurde dieses in einen isolierten Käfig gelegt und die Vitalfunktionen überwacht.

2.2.4.3. Gewinnung des Lungengewebes

6 Stunden nach Applikation der Partikelsuspensionen wurden die Tiere narkotisiert (100 mg/kg Ketavet und 18 mg/kg Rompun). Anschließend wurden sie unter Narkose eröffnet und durch ausbluten getötet.

Nach Freilegung der inneren Organe wurde mittels Tracheotomie eine Braunüle in die Lunge eingeführt und ca. 1 ml einer 4%igen PFA-Lösung eingefüllt. Die Trachea wurde wieder verschlossen und die Lunge frei präpariert. Die Lungen wurden in 50 ml Falcons mit 4% PFA auf Eis gegeben und für 4 Stunden geschüttelt. Anschließend wurde das PFA entfernt und eine 30%ige Succhroselösung zugegeben, so dass das Gewebe vollständig bedeckt ist. Die Falcons wurden über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Succrose-Lösung entfernt, die einzelnen Lungenlappen entnommen und in Tissue-Tek O.C.T. Compound in Cryomolds eingebettet. Das Gewebe wurde erst vorsichtig über flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend luftdicht bei -80°C gelagert.

2.2.5. Histologie

2.2.5.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die in Tissue-Tek eingebetteten Lungen wurden für ca. 10 Minuten von -80°C auf -20°C erwärmt. Das Cryostat wurde zuvor auf -22°C vorgekühlt, die Objekttemperatur betrug zwischen -20 und -23°C. Der gefrorene Gewebeblock wurde mit einem Tropfen Tissue-Tek auf dem Objektträger befestigt und in die Apparatur eingespannt. Die Schnitte wurden mit einer Schichtdicke von 6 µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die fertigen Objektträger wurden bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

2.2.5.2. Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die gekühlten Schnitte wurden für ca. 10 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt und in PBS rehydriert. Die Objektträger wurden zunächst für 3 Minuten mit Hämatoxylinlösung bedeckt. Anschließend wurden sie unter Leitungswasser vorsichtig gewaschen, bevor sie für 20-60 Sekunden in Differenzierungslösung (70% Ethanol; 1% HCl) inkubiert wurden. Die Objektträger wurden wiederum mit Wasser gewaschen und für ca. 30 Sekunden in 70% Ethanol dehydriert. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung in alkoholischer EosinY-Lösung für 30 Sekunden. Die Objektträger wurden zweimal für 3 Minuten mit 70% Ethanol gewaschen, danach kurz in 95% Ethanol, in 100% Ethanol getaucht. Nach kurzer Trocknungsphase wurden die OT unter dem Abzug für 5 Minuten in Xylol inkubiert, getrocknet und mit Mounting-Medium eingedeckelt.

2.2.5.3. Immunfluoreszenz-Färbung *in vivo*

Die gekühlten Schnitte wurden für ca. 10 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt und 2 Mal für 5 Minuten in Waschpuffer (1xTBS) rehydriert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Blockierlösung (5% ZNS + 0,3% Triton-X 100 in TBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach Entfernen der Lösung wurde der erste Antikörper in entsprechender Verdünnung auf die Gewebeschnitte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt, die Gewebeschnitte 3 Mal für 5 Minuten in 1xTBS gewaschen und der 2. Antikörper zugegeben. Die Objektträger wurden für 1 Stunde im Dunkeln in einer befeuchteten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie lichtgeschützt 3 Mal für 5 Minuten gewaschen, kurz trocknen gelassen und mit einem DAPI-haltigen Medium eingedeckelt.

2.2.6. Partikelaufnahme

2.2.6.1. Granularität in vitalen Zellen

Die Granularität der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden in 6-Well Platten in einer Konzentration von 2×10^4 /cm² ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch serumreduziertes Medium ersetzt und für weitere 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Partikelzugabe erfolgte für 4 Stunden. Nach Ende der Belastung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 300 µl Trypsin/EDTA zugegeben. Sobald ein Ablösen der Zellen erkennbar war, wurde die Reaktion mit dem gleichen Volumen 10% FCS in PBS abgestoppt. Die Zellsuspensionen wurden in FACS-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet in 400 µl PBS resuspendiert. Der Mittelwert des side scatters, als Indikator für die Granularität der gemessenen Zellen diente als Maß für die relative Partikelaufnahme verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

2.2.6.2. Granularität in vitalen Zellen bei inhibierter Endozytose

Die Granularität der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden in 6-Well Platten in einer Konzentration von 2×10^4 /cm² ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch serumreduziertes Medium ersetzt und für weitere 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die gesamte Endozytose in den Zellen zu inhibieren, wurde das serumreduzierte Medium abgossen, 3 ml kaltes, serumreduziertes Medium zugegeben und die Zellen für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Zur spezifischen Inhibition endozytotischer Mechanismen wurden die Zellen für 30 Minuten mit Filipin oder Cytochalasin D in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Partikelzugabe für 4 Stunden. Nach Ende der Belastung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 300 µl Trypsin/EDTA zugegeben. Sobald ein Ablösen der Zellen erkennbar war, wurde die Reaktion mit dem gleichen Volumen 10% FCS in PBS abgestoppt. Die Zellsuspensionen wurden in FACS-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet in 400 µl PBS resuspendiert. Der Mittelwert des side scatters, als Indikator für die Granularität der gemessenen Zellen diente als Maß für die relative Partikelaufnahme verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

2.2.7. Zytotoxizitätsassays

2.2.7.1. WST-1-Assay

Der Assay dient zur Bestimmung der Zytotoxizität mit dem Endpunkt Mitochondrien-Aktivität mit Hilfe des Kits „Cell Proliferation Reagent WST-1“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 100 μl der Zellsuspension der RLE-Zellen in einer Konzentration von $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert.

Die Zellen wurden zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden in 100 μl serumreduziertem Medium gehalten. Anschließend erfolgte die Belastung der Zellen mit den Mangan-Partikeln in verschiedenen Konzentrationen für 4 Stunden. Nach Ende der Belastungszeit wurden 10 μl des WST-1-Reagenz zu den Zellen zugegeben und für 1,5 Stunden inkubiert.

Dabei wird das WST (watersoluble Tetrazoliumsalt) in aktiven Mitochondrien zu einem gelben Formazan-Salz umgesetzt (s. Abb. 2.2).

Die fluorimetrische Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers Fluoroskan Ascent (Labsystems). Für die Absorption und Emission wurde die Filterkombination 440/600 nm gewählt. Die ermittelte Fluoreszenzintensität diente zur Bestimmung der relativen Zytotoxizität in Bezug auf die maximale Mitochondrienaktivität, die durch Zugabe von 100 μl PBS bestimmt wurde. Als Positivkontrolle wurden 15 Minuten vor Ende der Belastungszeit 10 μl einer 0,9%igen Triton-X-Lösung zu den Zellen gegeben.

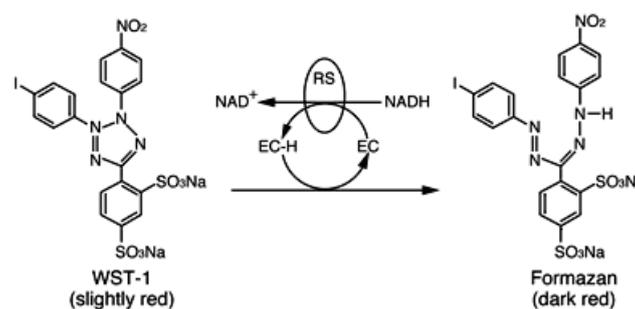


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Umsetzung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalses zu Formazan über mitochondriale Reduktasen

2.2.7.2. Neutralrot-Assay

Die Bestimmung der Lysosomenintegrität als Marker der Zytotoxizität der Partikel wurde mithilfe des Vitalfarbstoffs Neutralrot gemessen, der in Lysosomen vitaler Zellen gespeichert wird. Die Intensität des aufgenommenen Farbstoffs ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen und kann photometrisch bestimmt werden.

In einer 96-Well-Platte wurden die Zellen in einer Konzentration von $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausgesät und nach Kultivierung in Vollmedium und serumreduziertem Medium mit verschiedenen Partikelkonzentrationen für verschiedene Zeitpunkte belastet. Nach Ende der Belastung wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2 Mal mit warmem PBS gewaschen und 200 μl der frisch angesetzten Neutralrot-Lösung (5 mg/100 ml 0,5%-FCS-Medium) pro Well zugegeben und anschließend für 30-90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zwischenzeitlich immer wieder unter dem Mikroskop kontrolliert, da der Farbstoff nadelförmig ausfallen kann und somit die Reaktion beendet werden muss. Die Färbelösung wurde abgenommen, 100 μl Fixierlösung (1% CaCl_2 ; 1% PFA in dH_2O) zu den Zellen gegeben und sofort wieder entfernt. Um den Farbstoff aus den Zellen herauszulösen, wurden 100 μl Extraktionslösung (50% EtOH, 1% AcOH in dH_2O) zugegeben und die Platte für 20 Minuten bei RT geschüttelt.

Im Anschluss erfolgte die Messung mit Hilfe eines Fluorometers, Fluoroskan Ascent (Labsystems) bei einer Wellenlängenkombination von 540/550 nm.

2.2.7.3. Trypanblau-Assay

Die Bestimmung der Membranintegrität der Zellen erfolgte nach der Methode von Tautz (2008). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Aufnahme eines pH-abhängigen Farbstoffs in die Zellen, die nur möglich ist, wenn die Zellmembran Schädigungen aufweist. Bei vitalen Zellen ist der Farbstoff nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren, somit erscheinen diese unter dem Mikroskop ungefärbt.

In einer 24-Well-Platte wurden je 500.000 Zellen pro Well ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Vollmedium durch serumreduziertes Medium ersetzt und wiederum für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Partikelzugabe für 24 Stunden. Nach der Belastung wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA überschichtet, welches nach 2 Minuten wieder abgenommen wurde. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, bis man eine Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop erkennen konnte. Es folgte die Zugabe von 500 μl PBS, sowie 500 μl der Trypanblau-Lösung (0,4%).

Nach 3 Minuten Inkubation wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die vitalen (ungefärbten), sowie die Membran-geschädigten (blauen) Zellen ausgezählt.

2.2.7.4. Proliferations-Assay mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der Partikel wurde der Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen bestimmt. In einer 24-Well platte wurden je 500.000 Zellen pro Well ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Partikelzugabe für 24 bzw. 48 Stunden. Nach Ende der Belastung wurde das Medium entfernt, die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA überschichtet, welches nach 2 Minuten wieder abgenommen wurde. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, bis man eine Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop erkennen konnte. Es folgte die Zugabe von 500 µl PBS, sowie 500 µl der Trypanblau-Lösung (0,4%).

Nach 3 Minuten Inkubation wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die vitalen (ungefärbten) Zellen ausgezählt.

2.2.8. Messung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

2.2.8.1. Messung der ROS-Generierung im zellfreien System mittels Fluorometrie

Die Bestimmung der partikelinduzierten ROS-Generierung im zellfreien Medium erfolgte mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffs 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA). Das H₂DCF-DA wurde als 100 mM Stocklösung in DMSO angesetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Bildung des nichtfluoreszierenden DCFH wurde die Stocklösung zu gleichen Teilen mit 1 M NaOH vermischt und zur hydrolytischen Abspaltung des Acetat-Rests 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Endkonzentration von 20 µM DCFH, 0,1% DMSO mit serumarmen Medium verdünnt und so neutralisiert.

In einer 96-Well-Platte (0,32 cm²/ Well) wurden pro Well 10 µl der Partikelsuspension vorgelegt. Jeweils 100 µl der 20 µM DCFH-Lösung wurden hinzu pipettiert. Die fluorometrische Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers, Fluoroskan Ascent (Labsystems), bei 37°C. Für die Absorption und Emission wurde die Filterkombination 485/538 nm gewählt. Die ermittelte Fluoreszenzintensität diente zur Bestimmung der relativen ROS-Generierung.

2.2.8.2. Durchflusszytometrische Messung der intrazellulären ROS-Generierung mittels H₂DCF-DA

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS wurden die Zellen (abgewandelt nach Bass et al. 1983) nach entsprechender Partikelbelastung zweimal mit 37°C warmen HBSS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) gewaschen und anschließend mit einer frisch angesetzten 20 µM DCF-DA, 0,1% DMSO Lösung in warmen HBSS(+ / +) beschichtet. Nach einer 20 minütigen Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen einmal mit HBSS(+ / +) gewaschen und dann für 3 – 5 min trypsinisiert. Die durch Klopfen abgelösten Zellen wurden in 1 ml kaltem HBSS(+ / +) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (4 min, 1000 x g, RT) wurden die pelletierten Zellen in 300 µl kaltem HBSS(+ / +) resuspendiert und bis zur FACS-Messung auf Eis und im Dunkeln gehalten. Die Erfassung und Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Instrumenten-Software BD Cell Quest 3.3. Aufgenommen wurden die FSC- und SSC-Intensität als Maß für die Größe und Granularität sowie die FL1-Intensität als Parameter für die DCF-Fluoreszenz, und damit für die intrazelluläre ROS-Generierung.

Für jeden experimentellen Ansatz wurden 10.000 Zellen analysiert. Die aufgenommenen Daten wurden als *Dotplot* (korrelierte Darstellung von *forward* und *side scatter*) oder als univariantes Histogramm (Fluoreszenzintensität FL1 gegen Anzahl gemessener Zellen) dargestellt. Zur Quantifizierung wurde die durchschnittliche FL1-Fluoreszenzintensität (*FL1 mean fluorescence*) ermittelt. Diese diente als Maß für die Bestimmung der relativen intrazellulären ROS-Generierung.

2.2.8.3. Durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Superoxid-Generierung mittels MitoSox-Red

Zur Bestimmung der Generierung der intrazellulären Superoxid-Anionen wurden die Zellen in 6 cm Schalen in einer Konzentration von 2x10⁴ Zellen/cm² ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch serumreduziertes Medium ersetzt und wiederum für 24 Stunden inkubiert. Nach entsprechender Partikelbelastung wurde zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Die MitoSox Stocklösung wurde nach Herstellerangaben in DMSO gelöst und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gehalten.

Die Stocklösung wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zu den Zellen gegeben und bei 37°C für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 300 µl Trypsin/EDTA pro Schale zugegeben.

Sobald ein Ablösen der Zellen zu erkennen war, wurde das dreifache Volumen an 10%FCS in PBS zugegeben, um die Trypsin-Reaktion zu unterbrechen. Die Zellsuspensionen wurden in FACS-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 1200 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Messung am FACS.

2.2.9. Proteinbiochemische Methoden

2.2.9.1. Zellyse und Proteinextraktion

Zur Herstellung von Proteinextrakten für Western-Blot-Analysen wurden die Zellen zunächst 2 Mal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Radioimmunopräzipitations (RIPA)-Puffer (80 µl für 9,6 cm²) und durch Klopfen und/oder Abschaben lysiert. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden die Lysate in Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Durch Vortexen der wieder aufgetauten Lysate wurden die restlichen Zellbestandteile weiter zerkleinert und für 15 min bei 4°C mit 16.000 x g abzentrifugiert.

Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration auf Eis gelagert.

2.2.9.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Extrakten nach der Methode von Lowry et al. (1951) wurde der DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden nacheinander 5 µl Proteinextrakt in Doppelbestimmung, 25 µl Lösung A' (20 µl Lösung S pro ml Lösung A) und 200 µl Lösung B pipettiert. Nach 20 min Inkubation in Dunkelheit bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 630 nm. Die Proteinkonzentration ließ sich anhand von parallel aufgetragenen Standardproben mit definierter BSA-Konzentration errechnen.

DC Protein Assay Kit:

Lösung A: basische Kupfer-Tartrat-Lösung.

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

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

2.2.9.3. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Laemmli et al., 1970). Hierzu wurde in entsprechend zusammengesetzten Minigel-Glasplatten zunächst ein 1 mm dickes 10%iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, ein 3%iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und der Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesetzt. Das fertige Gel wurde an eine vertikale Minigelkammer angebracht und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden mit 2x Elektrophorese-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen pipettiert. Pro Geltasche wurden 5 µg Protein aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer konstanter Spannung von 50-75 V, und nach Einlaufen der Lauffront in das Trenngel bei 100-120 V. Als Protein- Größenstandard diente die ColorPlus Prestained Protein Leiter (BioLabs, New England, USA).

2.2.9.4. Western Blot Transfer

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine per Elektrotransfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF-)Membran übertragen. Für den Transfer wurde der Bio-Rad Criterion™-Blotter nach Angaben des Herstellers verwendet. In der mitgelieferten aufklappbaren Transferkammer wurden dazu nacheinander aufgelegt: eine Lage Plastikwolle, eine Lage Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, eine Lage Filterpapier, eine Lage Plastikwolle. Die Transferkammer wurde zugeklappt und in den mit kaltem Transferpuffer gefüllten Tank derart eingesetzt, dass die Membran-Seite mit der Anoden-Platte übereinstimmte. Der Transfer erfolgte für 1-1,5 h bei 50 V unter Rühren (Magnetrührer) und Kühlung (mitgeliefertes, wiederverwendbares Kühlelement).

2.2.9.5. Immunologischer Proteinnachweis durch Chemilumineszenz

Der Nachweis der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe verschiedener Antikörper in den entsprechenden Inkubationslösungen.

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

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

2.2.9.6. Densitometrische Auswertung von Immunsignalen

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

2.2.10. Immunfluoreszenzfärbung *in vitro*

2.2.10.1. IF-Färbung zur mikroskopischen Analyse

Zur immunfluoreszenten Färbung spezifischer Proteine *in vitro* wurden zunächst 22x22mm große Deckgläschen sterilisiert. Dazu wurden diese in 100% Ethanol getaucht, mit Hilfe eines Bunsenbrenners sterilisiert und in jedes Well einer 6-Well Platte gelegt. Anschließend wurden diese mit 1 ml Vollmedium für 20 Minuten überschichtet. Das Medium wurde entfernt und durch eine Zellsuspension ersetzt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^4 /cm² ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch serumreduziertes Medium ersetzt und für mindestens 18 Stunden inkubiert. Nach entsprechender Partikelbelastung wurde zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen und die Zellen mit vorgewärmtem 4%PFA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Daraufhin folgte eine weitere Fixierung mit gekühltem Methanol bei -20°C für 10 Minuten.

Die Zellen wurden nach der Fixierung 2 Mal mit PBS gewaschen und 1 ml Blockierlösung (3%ZNS+3%BSA+0,3%Triton-X 100 in PBS) pro Well zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Blockierlösung möglichst rückstandslos entfernt. Die Deckgläschen wurden umgedreht und ca. 100 µl der Antikörperlösung luftblasenfrei darunter pipettiert. Die Zellen wurden wiederum über Nacht bei 4°C gelagert. Die Antikörperlösung wurde entfernt, die Deckgläschen wieder umgedreht und 2 Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 800 µl Sekundär-Antikörperlösung zugegeben und für 2 Stunden lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2 Mal mit PBS für 5 Minuten gewaschen und anschließend kurz trocknen gelassen. Die Deckgläschen wurden mit einem DAPI-haltigen Mounting-Medium auf Objektträgern befestigt.

2.2.10.2. IF-Färbung zur Hochdurchsatz-Analyse

Zur immunfluoreszenten Färbung spezifischer Proteine für die Analyse mittels HCS (*high content screening*) reader Cellomics wurden die Zellen in 96-Well Platten in einer Konzentration von 2×10^4 /cm² (Endvolumen 100µl) ausgesät und 24 Stunden anwachsen gelassen. Anschließend wurde das Vollmedium durch serumreduziertes Medium ersetzt und mindestens 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Partikelbelastung wurde das Medium entfernt, die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 4%PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde abgenommen, gesondert aufgefangen und 100 µl eiskaltes Methanol in jedes Well gegeben.

Die Zellen wurden für 10 Minuten bei -20°C fixiert. Das Methanol wurde abgegossen, die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und 100 µl Blockierlösung (3%ZNS+3%BSA+0,3%Triton-X 100 in PBS) zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Blockierlösung entfernt und 25 µl Primär-Antikörperlösung zugegeben. Die Zellen wurden wiederum über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt, die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen, 100µl der Sekundär-Antikörperlösung zugegeben und lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Nach 2 Stunden wurde die Lösung entfernt, 2 Mal mit PBS gewaschen und 100 µl DAPI-Lösung (1:1000 in PBS) für 5 Minuten zugegeben. Anschließend wurde erneut 2 Mal mit PBS gewaschen, 100 µl PBS pro Well zugegeben und die Platten bis zur Messung lichtgeschützt eingepackt bei 4°C gelagert. Die Messung erfolgte am Cellomics ArrayScan HCS Reader (Thermo Scientific) mit Hilfe der Software *Cellomics Scan*. Dabei werden pro Well 16 (bzw. 64) Bilder aufgenommen und anschließend die Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengelegt.

2.2.10.3. Messung der intrazellulären ROS-Generierung mit DHE

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS wurden die Zellen nach entsprechender Partikelbelastung zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend mit einer frisch angesetzten 20 µM DHE, 0,1% DMSO Lösung in warmen PBS beschichtet. Nach einer 45 minütigen Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 5 Minuten mit DAPI gefärbt (1:1000 in PBS). Anschließend wurde erneut 2 Mal mit PBS gewaschen, 100 µl kaltes PBS pro Well zugegeben und die Platten bis zur Messung lichtgeschützt eingepackt und auf Eis gelagert. Die Messung erfolgte am Cellomics ArrayScan HCS Reader (Thermo Scientific) mit Hilfe der Software *Cellomics Scan*. Dabei wurden pro Well 16 Bilder aufgenommen und anschließend die Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengelegt.

2.2.10.4. Auswertung der Immunfluoreszenz-Intensität

Die Quantifizierung der Signalintensität der fluoreszent markierten Zellen erfolgte mittels der Software *Cellomics Scan* von Thermo Scientific. Die zuvor aufgenommenen Fluoreszenzbilder werden mit einem speziell eingestellten Programm erneut gescannt. Dabei geht das Programm von der DAPI-Färbung aus und definiert pro gemessenem Zellkern eine Zelle. Zellkerne, die zu groß, klein, hell, dunkel sind oder am Rand des Bildes liegen, werden bei der Messung nicht berücksichtigt. Anhand der Position der Zellkerne aus dem DAPI-Kanal wird nun im zweiten Kanal der Umriss der Zelle festgelegt und die Fluoreszenz innerhalb dieses Bereiches gemessen und quantifiziert. Die Gesamtfluoreszenz wird durch die Anzahl der validen Zellkerne geteilt und die totale Fluoreszenz einer Zelle als Mittelwert bzw. Median angegeben.

2.2.11. Statistik

Alle Experimente ergaben, wenn nicht anders vermerkt, reproduzierbare Ergebnisse. Diese werden, sofern nicht anders angegeben, als relative Mittelwert \pm Standardfehler in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle angegeben. Die Datenbewertung erfolgte mittels Statistik-Software (SPSS). Als Statistik-Test wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließender Dunnett-T-Testung der Rohdaten durchgeführt. Zur Beurteilung der Signifikanz zwischen zwei Behandlungsgruppen wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Differenz von Werten mit $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt (Zöfel 1992).

2.2.12. Abbildungen

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

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der membranabhängigen Signaltransduktion, ausgelöst durch verschiedene Nanomaterialien. In der Arbeitsgruppe wurden in den vergangenen Jahren verschiedene zelluläre Signalprozesse untersucht und Mechanismen aufgeklärt, die spezifisch durch Kohlenstoff-Nanopartikel (CNP) ausgelöst werden (Unfried et al., 2007). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass diese Signalprozesse charakteristisch für Nanopartikel sind, da sie durch größere Kohlenstoff-Partikel (CP) nicht ausgelöst wurden (Peuschel et al., 2010). Um nun erstmals zu überprüfen, ob diese Signalkaskaden nicht nur durch CNP ausgelöst werden, sondern ebenfalls für Nanopartikel anderer chemischer Zusammensetzung relevant sind, wurden in vivo- und in vitro-Versuche mit Modellpartikeln unterschiedlicher Größe, Oberfläche, sowie chemischer Zusammensetzung durchgeführt. Die verwendeten Partikel bestehen aus Titan- und Siliziumdioxid. CNP und CP wurden als interne Kontrollen verwendet.

Wie schon in Kapitel 1 beschrieben, wächst die Anzahl verschiedener Nanopartikel in der Medizin, Kosmetik, Industrie und vielen anderen Bereichen. Insbesondere Nanomaterialien, bestehend aus Transitionsmetallen, oder in Form von Nanoröhren gewinnen immer mehr an Bedeutung. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, schnelle und zuverlässige Methoden zur Bestimmung der Toxizität solcher Nanomaterialien zu etablieren. Als Beispiel-System für moderne Nanomaterialien wurde für die nachfolgenden Versuche ein Set schwer löslicher Manganoxid-Nanopartikel verwendet. Hierbei wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, den Einfluss partikelinduzierter ROS auf die Induktion der membranabhängigen Signaltransduktion zu untersuchen. Aufgrund der chemischen Eigenschaften der Transitionsmetalle in Bezug auf eine mögliche Katalysierung der Fenton-Reaktion, wurde außerdem der Einfluss Redox-Aktivität der Partikel auf die Aktivierung von MAPK untersucht. Darüber hinaus war es möglich, die Partikel in unterschiedlicher Gestalt zu synthetisieren, so dass im Folgenden nicht nur der Unterschied zwischen NP und nicht-NP untersucht werden konnte, sondern es zusätzlich möglich war, die Bedeutung von faserförmigen Nanomaterialien zu untersuchen.

3.1. Modellpartikel-System

3.1.1. Nanopartikel-spezifische Aktivierung von MAP-Kinasen *in vivo*

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gibt es bereits Hinweise auf einen Einfluss von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf die Aktivierung von Signalwegen *in vitro* (Sydlik et al., 2006; Unfried et al., 2008; Weissenberg et al., 2010).

Als Nachweis der Relevanz von MAP-Kinasen als Marker für die Induktion pathogener Endpunkte wurde in einem ersten Versuch die Aktivierung von ERK1/2, JNK1/2 sowie p38, ausgelöst durch Kohlenstoff, Silica und Titandioxid in einem Mausmodell histologisch untersucht. In Anlehnung an vorausgegangene Experimente wurden C57-BL/6 Mäuse für 6 Stunden mit 2,5 mg/kg behandelt. Bei dieser Massendosis wird mit CNP *in vivo* eine Aktivierung von MAPK beobachtet. Wie bereits in Kapitel 1.8 beschrieben, lösen die NP in *in vitro* Versuchen die aktivierende Phosphorylierung dieser MAPK aus. Erste Vorversuche zur Entzündungskinetik zeigten, dass bis zu 6 Stunden nach Belastung mit den Partikeln keine Entzündungsreaktion zu beobachtet werden konnte (Abb. 1.3). Veränderungen in der Aktivierung von MAPK werden in diesem Versuchsmodell also nicht durch Aktivierung von Entzündungskaskaden, sondern höchstwahrscheinlich durch direkte Partikel-Zell-Interaktion ausgelöst. Deshalb wurde diese Versuchsanordnung zur Analyse der MAPK-Aktivierung verwendet.

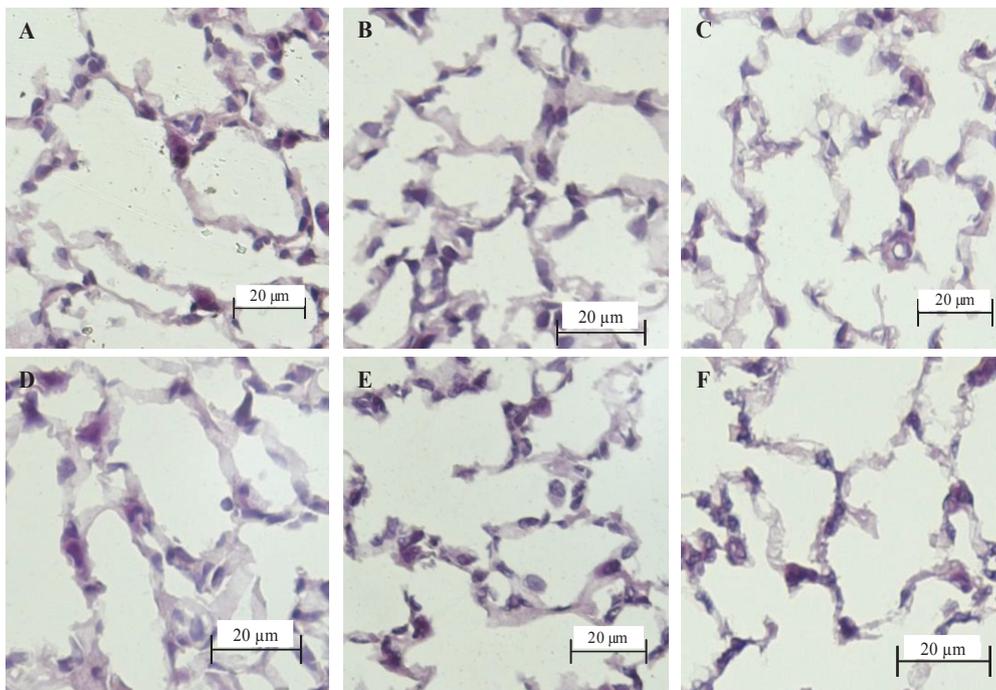


Abb. 3.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Gefrierschnitten: C57BL/6-Mäuse wurden für 6 Stunden mit 2,5 mg/kg belastet, die Lungen entnommen und eingebettet und Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden mit Eosin und Hämatoxylin zur Darstellung der Zellkerne, sowie Gewebe-Strukturen. A = PBS; B = CNP; C = CP; D = Nano-SiO₂; E = Nano-TiO₂; F = TiO₂.

In einer Voruntersuchung wurden die Lungenpräparate mit einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt, um mögliche Unterschiede in der alveolaren Struktur der Lunge zu identifizieren. Bei allen applizierten Partikeln (B-F) zeigten sich keine sichtbaren Veränderungen oder Schädigungen im Vergleich zur Kontrollexposition mit PBS (A) (Abb. 3.1).

Da zur Überprüfung der Relevanz des *in vitro* Systems alveolare Bereiche der Mäuselungen betrachtet werden, wurden in einem Vorversuch zur eindeutigen Identifizierung der alveolaren Bereiche im Schnittpräparat Zelltyp-spezifische Färbungen der epithelialen TypII-Zellen durchgeführt.

In Abbildung 3.2 sind die alveolaren TypII-Zellen mittels SPC (*surfactant protein C*) markiert und fluoreszierend gefärbt. In allen Abbildungen sind die alveolaren TypII-Zellen deutlich durch die rote Fluoreszenz im Zytoplasma zu erkennen. Zwischen den Belastungen sind keine Unterschiede sichtbar.

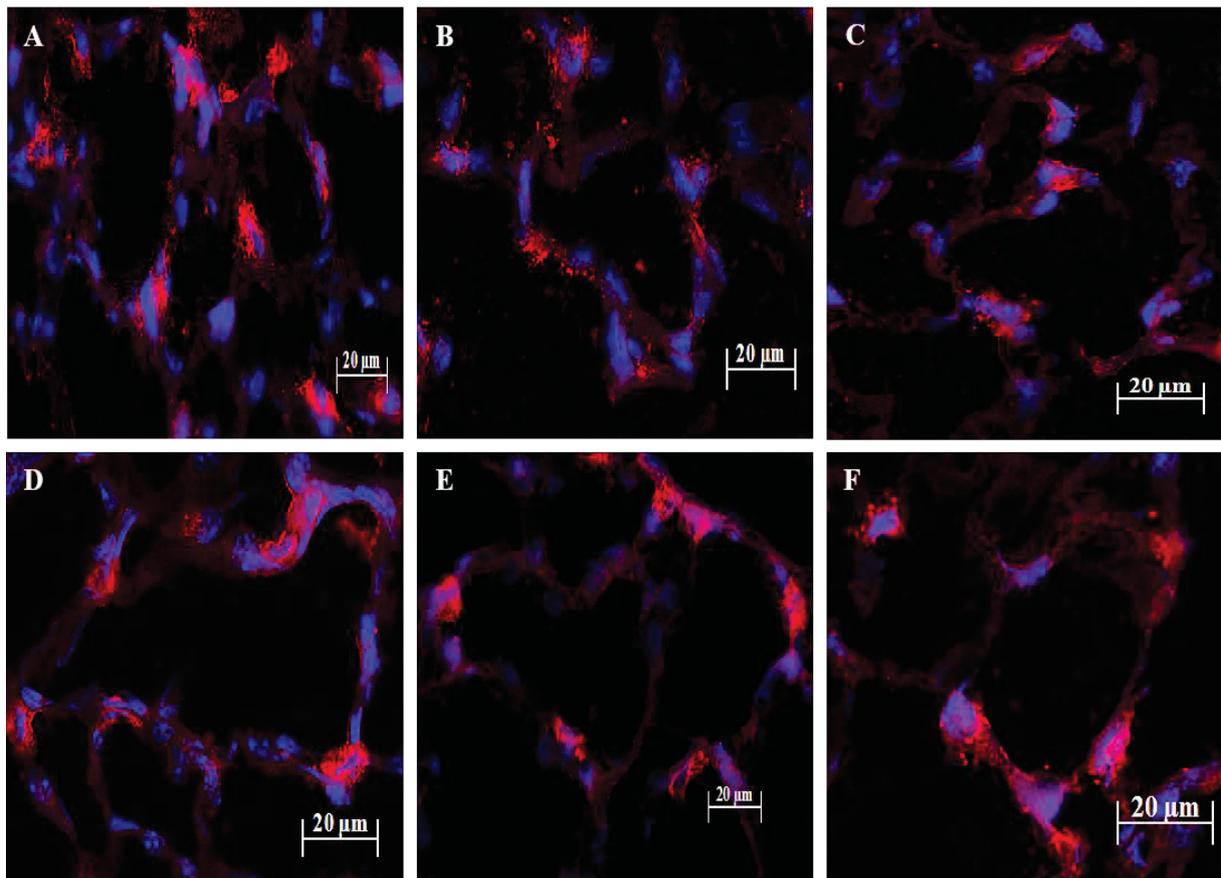


Abb. 3.2 Immunhistochemische Färbung von SPC in Gefrierschnitten von Mäuselungen: C57/BL-6-Mäuse wurden für 6 Stunden mit 2,5 mg/kg KG der Partikel behandelt. Gezeigt sind repräsentative Alveolar-Bereiche aus fluorescent gefärbten Gefrierschnitten von je 3 Tieren pro Gruppe. Rot = *Surfactant protein C* (SPC) ; blau = DAPI; A = PBS; B = CNP; C = CP; D = Nano-SiO₂ ; E = Nano-TiO₂; F = TiO₂.

Aus den in Kapitel 1.8 beschriebenen Vorversuchen der Arbeitsgruppe gibt es Hinweise darauf, dass MAPK, vergleichbar zu den in vitro-Befunden, spezifisch durch NP in vivo aktiviert werden können. In Western Blot Analysen des Lungenhomogenats konnte eine erhöhte Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch Belastung mit NP gezeigt werden (Abb. 1.4). Zur Verifizierung der Spezifität der Reaktionen in den Epithelzellen wurde im Folgenden eine immunhistologische Färbung der aktivierten MAPK in Gefrierschnitten der Lunge durchgeführt. Hierbei wurden gezielt alveolare Bereiche untersucht, um so die Relevanz des in vitro-Systems, basierend auf Epithelzellen der Rattenlunge, zu verifizieren. In jeweils 3 Tieren pro Gruppe, die mit Nanopartikeln belastet wurden, ist ein Anstieg der Fluoreszenz und somit eine verstärkte Aktivierung der MAP-Kinasen im Vergleich zu den Tieren, die mit den nicht-Nanopartikeln behandelt wurden, sichtbar (Abb. 3.3 - 3.5).

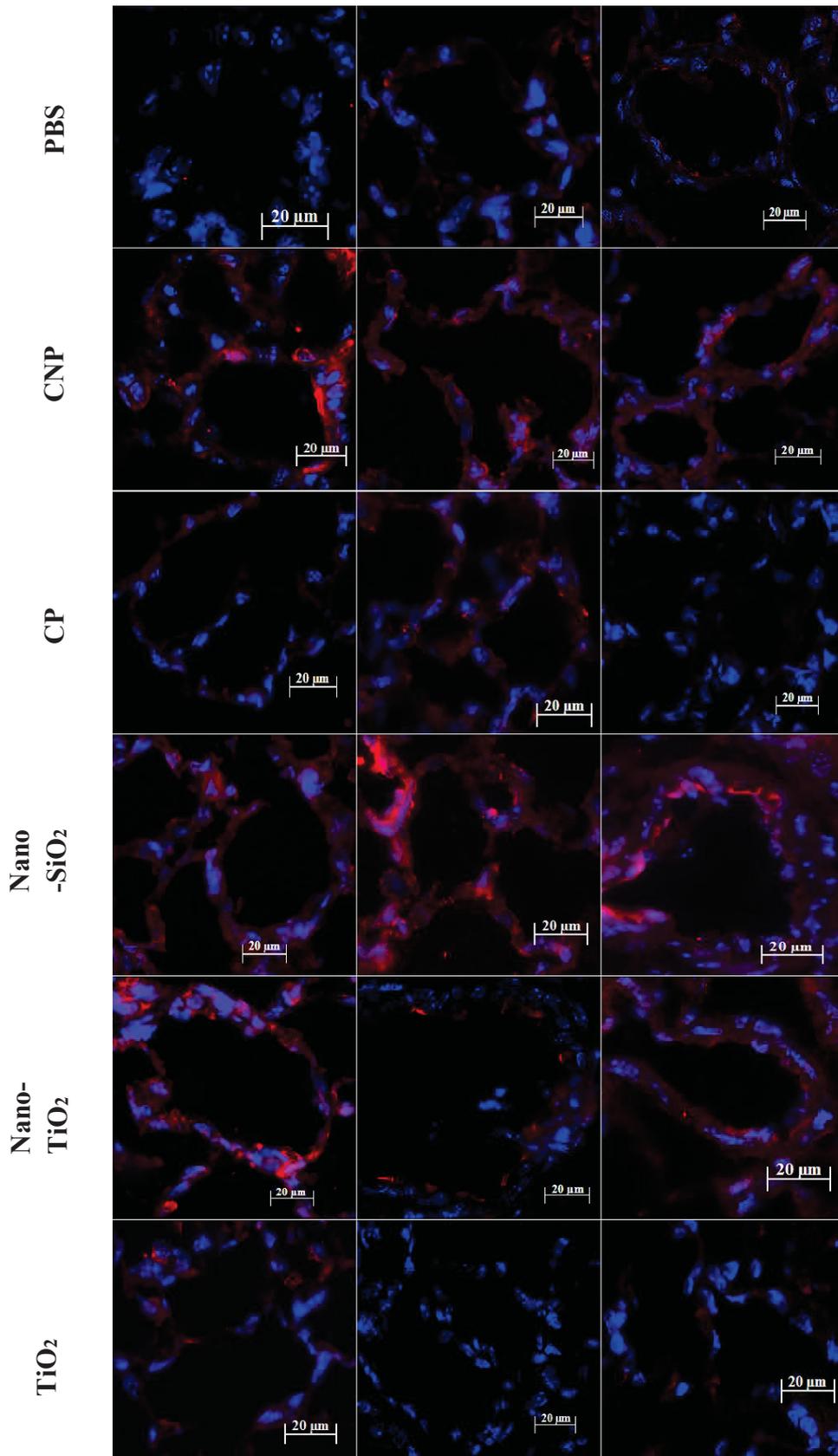


Abb. 3.3 Immunohistochemische Färbung von pERK1/2 in Gefrierschnitten von Mäuselungen: C57/BL-6-Mäuse wurden für 6 Stunden mit 2,5 mg/kg KG der Partikel behandelt. Gezeigt sind repräsentative Alveolar-Bereiche aus fluoreszent gefärbten Gefrierschnitten von je 3 Tieren pro Gruppe. Rot = phospho-ERK1/2; blau = DAPI

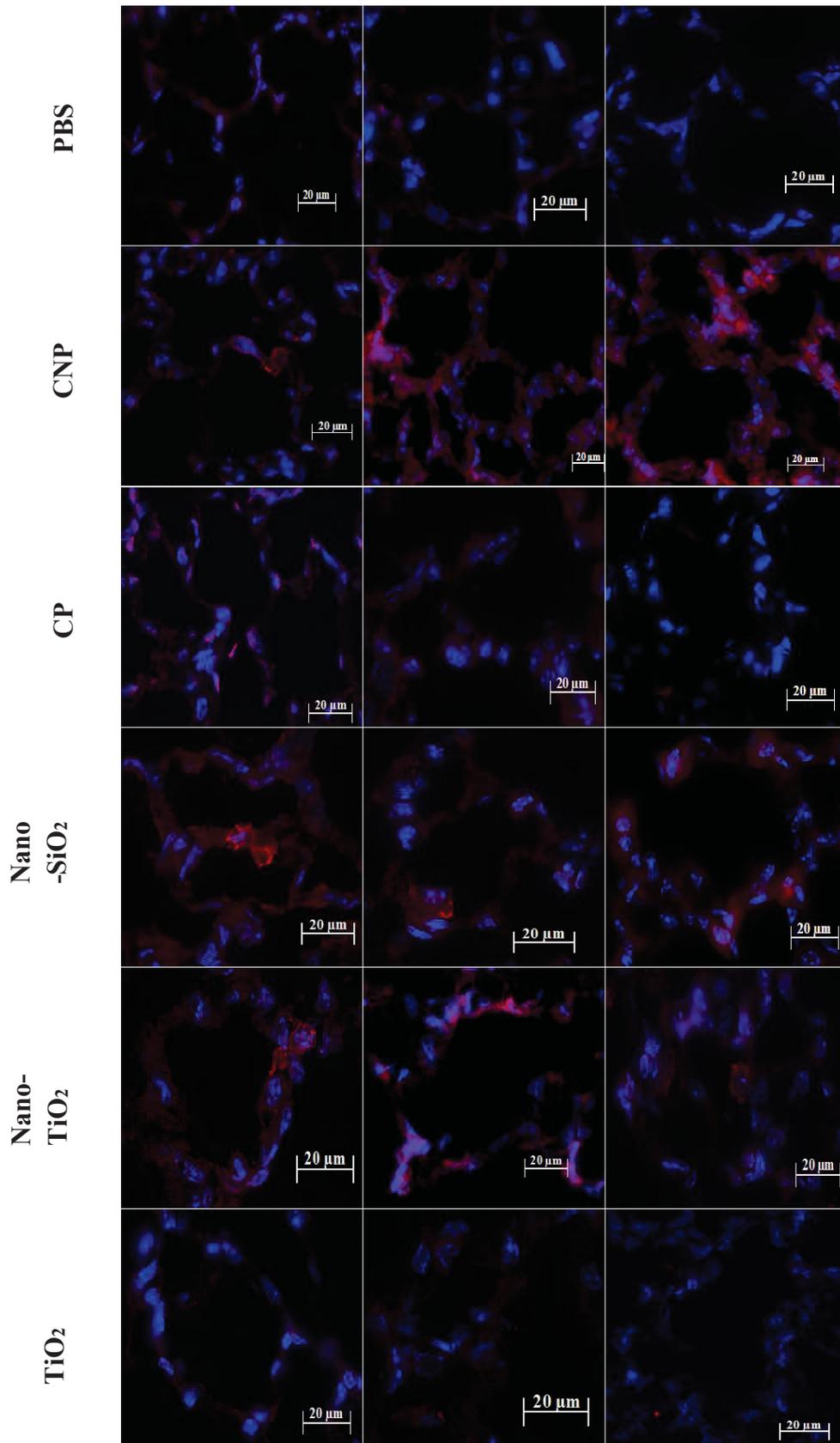


Abb. 3.4 Immunohistochemische Färbung von pJNK1/2 in Gefrierschnitten von Mäuselungen: C57/BL-6-Mäuse wurden für 6 Stunden mit 2,5 mg/kg KG der Partikel behandelt. Gezeigt sind repräsentative Alveolar-Bereiche aus fluoreszent gefärbten Gefrierschnitten von je 3 Tieren pro Gruppe. Rot = phospho-JNK1/2; blau = DAPI

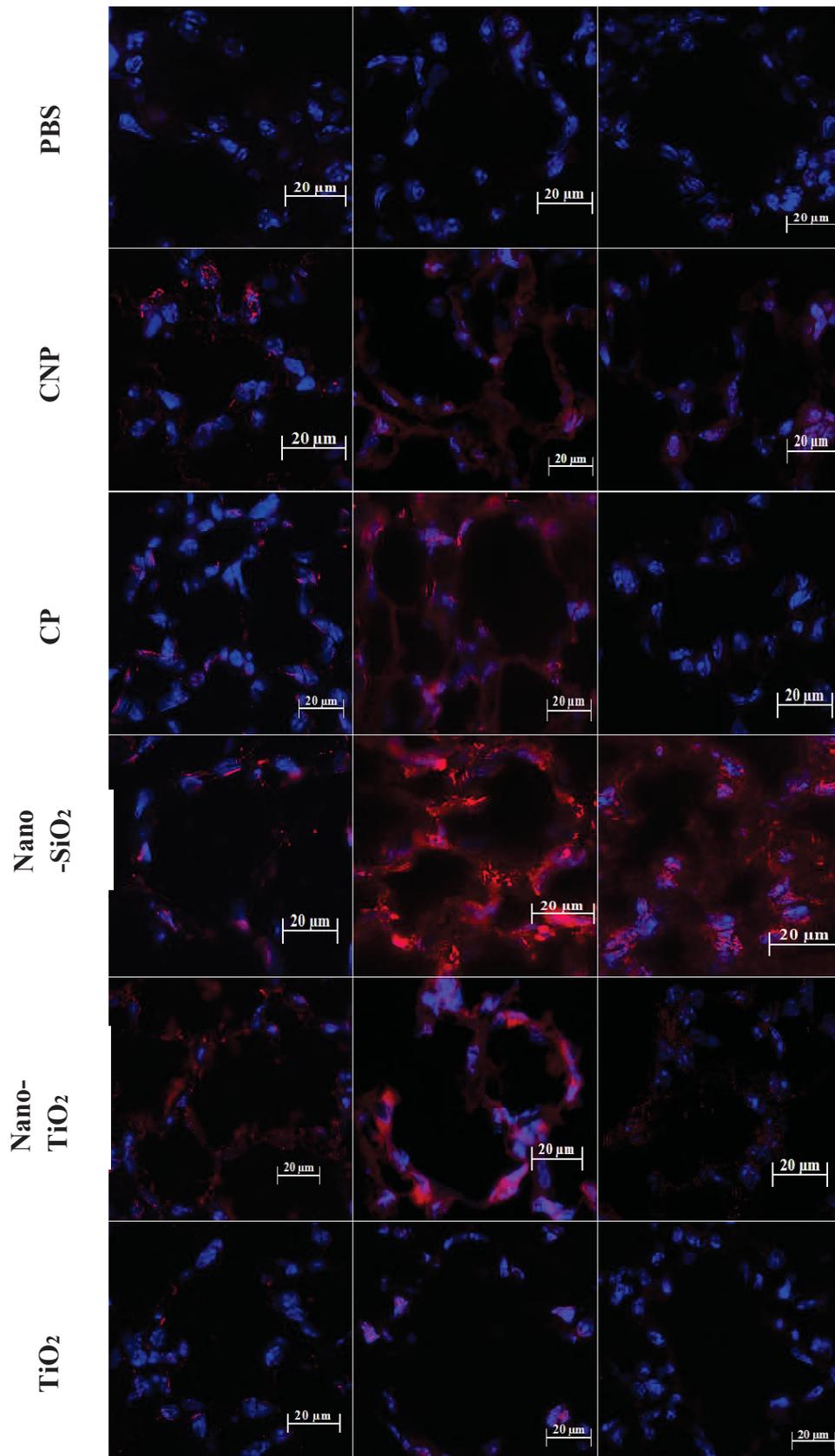


Abb. 3.5 Immunohistochemische Färbung von pP38 in Gefrierschnitten von Mäuselungen: C57/BL-6-Mäuse wurden für 6 Stunden mit 2,5 mg/kg KG der Partikel behandelt. Gezeigt sind repräsentative Alveolar-Bereiche aus fluorescent gefärbten Gefrierschnitten von je 3 Tieren pro Gruppe. Rot = phospho-P38; blau = DAPI

Abbildung 3.3 zeigt eine eindeutige Phosphorylierung von ERK1/2 in den Epithelzellen der Lungenalveolen der behandelten Mäuse. Obwohl keine objektive Quantifizierung der Fluoreszenzsignale vorgenommen wurde, lassen sich doch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Signalstärken zu erkennen. In der Kontrollgruppe, die nur PBS instilliert bekam, ist nur eine schwache bis gar keine Färbung zu erkennen. In den Tieren, die mit CNP und Nano-SiO₂ behandelt wurden, erkennt man einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle. Für Nano-Titandioxid ist der Anstieg ein wenig schwächer, allerdings auch sehr inhomogen aber dennoch deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mit CP und TiO₂ behandelten Tiere scheinen nur zu einer mäßigen bis gar keinen Aktivierung der MAP-Kinase zu führen. Versucht man, die Stärke der Aktivierung subjektiv einzuschätzen, kann diese wie folgt abgestuft werden: CNP/Nano-SiO₂/Nano-TiO₂ > CP/TiO₂ > PBS

In Abbildung 3.4 ist die partikelinduzierte Phosphorylierung von JNK1/2 in behandelten Mäuselungen dargestellt. In den 3 Tieren der Kontrollgruppe ist keine oder nur eine geringe Fluoreszenz erkennbar. Im Vergleich dazu ist die Färbung in den Mäusen, die mit Kohlenstoff- und Siliziumdioxid-Nanopartikeln behandelt wurden, deutlich stärker. Die Induktion durch Nano-Titandioxid ist im Vergleich zu den anderen Behandlungen schwächer zusehen, erscheint dennoch geringfügig erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Phosphorylierung von JNK1/2 ist stärker in den Gruppen, die mit Nanopartikeln behandelt wurden. Durch die Belastung mit CP und nicht-Nano Titandioxid ist ebenfalls eine erhöhte Aktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar, diese liegt allerdings nicht im gleichen Ausmaß vor, wie mit Nanopartikeln. Die Einschätzung der Intensitätsstärke ist in diesem Falle wie folgt: CNP > Nano-SiO₂ > Nano-TiO₂ > CP/TiO₂ > PBS

Abbildung 3.5 zeigt die partikelinduzierte Phosphorylierung von P38 *in vivo*. Trotz teilweise sichtbarer Unterschiede innerhalb der behandelten Gruppen ist eine verstärkte Fluoreszenz in den Gruppen zu erkennen, die mit Nanopartikeln behandelt wurden. Im Vergleich zu ERK1/2 und JNK1/2 ist die Fluoreszenz eher in einzelnen Zellen lokalisiert, als im gesamten alveolaren Bereich. Die Aktivierung ausgelöst durch Nano-Siliziumdioxid ist in den betrachteten Gruppen am deutlichsten sichtbar. Die Gruppen, die mit Kohlenstoff- und Titandioxid-Nanopartikeln behandelt wurden, zeigen ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle, die allerdings nicht so stark ausgeprägt scheint, wie in der Siliziumdioxid-Behandlung. Für die Belastung mit CP ist eine leichte Aktivierung zu erkennen, die nur wenig schwächer ist, als bei der Behandlung mit CNP.

Für die Belastung mit feinem Titandioxid ist nahezu kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu sehen. Die Intensität der fluoreszenten Färbung von P38 kann wie folgt abgeschätzt werden:

Nano-SiO₂ > Nano-TiO₂ > CNP > CP > TiO₂/PBS

3.1.2. Einfluss der Modellpartikel auf die Viabilität von RLE-Zellen

Für die nachfolgenden mechanistischen Versuche im in vitro Modell mit Lungenepithelzellen sollten nur Partikel-Konzentrationen verwendet werden, die keine zytotoxischen Effekte auslösen konnten, um eine unspezifische Aktivierung der MAPK auszuschließen und einen direkten Partikeleffekt zu identifizieren.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Partikelkonzentrationen auf die Proliferation der Zellen untersucht. In Abbildung 3.6 sind die absoluten Zellzahlen nach 24, bzw. 48 Stunden Belastung dargestellt.

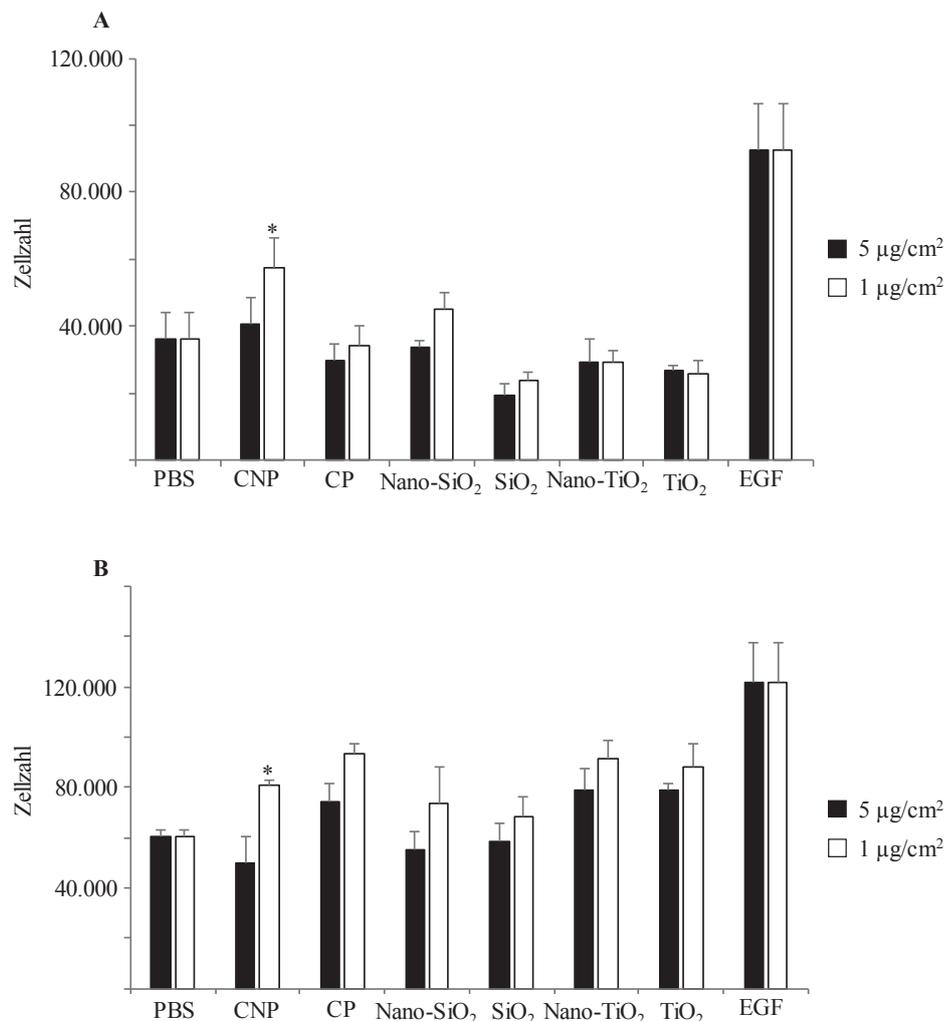


Abb. 3.6 Zellproliferation nach Partikelbelastung für 24 und 48 Stunden mit 1: RLE-6TN wurden für 24 (A) und 48 Stunden (B) mit 5 µg/cm² bzw. 1 µg/cm² der Partikelsuspensionen belastet. Die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt und die ungeschädigten Zellen mit einer Neubauerzählkammer ausgezählt und die Gesamtzellzahl berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, p < 0,05)

In Abbildung 3.6 A ist die absolute Zellzahl nach Partikelbelastung für 24 Stunden dargestellt. Für die Belastung mit SiO_2 , sowie Nano- und nicht-Nano Titandioxid ist eine Abnahme der Proliferationsrate nach 24 Stunden zu erkennen, die aber nicht signifikant ist. CNP führt nach Belastung mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu einer signifikant erhöhten Proliferation auf das 1,5-fache der Kontrolle. Nano- SiO_2 führt nach Belastung mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu einem ca. 1,3-fachen, nicht-signifikanten Anstieg der Zellzahl. Für alle anderen Belastungen ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zu sehen.

In Abbildung 3.6 B ist die Zellzahl nach 48 Stunden Partikelbelastung dargestellt. Die Belastung mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CNP führt ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate auf das 1,5-fache der Kontrolle. Für CP, sowie für beide Titandioxid-Partikel ist ebenfalls eine Erhöhung auf das 1,5- bis 1,7-fache der Kontrolle zu sehen, die nicht signifikant ist. Auch die Belastung mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der 3 genannten Partikel führt zu einer 1,4- bis 1,5-fachen Erhöhung der Zellzahl, die jedoch ebenfalls nicht signifikant ist. Für alle anderen Partikelbelastungen ist kein Unterschied zur Kontrolle zu erkennen.

Zur genaueren Bestimmung der Partikelkonzentrationen wurde ein weiterer Zellviabilitäts-Assay durchgeführt. Dazu wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe des Farbstoffs WST-1 bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse nach 24 Stunden Belastung sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Es scheint eine inverse Korrelation durch die Belastung mit allen drei Nanopartikeln und ebenfalls durch die Belastung mit nicht-Nano Titandioxid zu geben, die allerdings nicht signifikant ist. Für die höchste Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist in allen Belastungen, mit Ausnahme von CP, eine Abnahme der Aktivität zu erkennen, die jedoch nicht signifikant ist. Ebenso ist für Nano-Siliziumdioxid, sowie TiO_2 eine Zunahme der Aktivität für $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu sehen, die jedoch ebenfalls nicht signifikant ist.

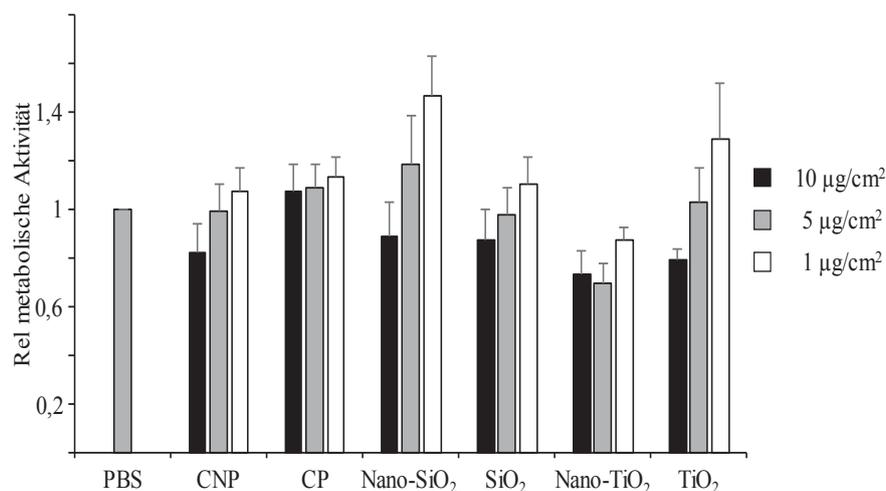


Abb. 3.7 Metabolische Aktivität nach Partikelbelastung für 24 Stunden: RLE-6TN wurden für 24 Stunden mit $1, 5$ und $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der relativen metabolischen Aktivität bezogen auf die PBS-Kontrolle aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.1.3. Untersuchung MAPK-spezifischer Signalprozesse mit einer Mikroskopie-basierten „*Medium throughput*“-Methode

Zur Untersuchung der molekularen Ereignisse, sowie Auslöser, die zu einer Nanopartikel-spezifischen Aktivierung von MAP-Kinasen führen, wurden verschiedene Versuche mit dem Modellpartikel-System, bestehend aus Kohlenstoff, Siliziumdioxid und Titandioxid, durchgeführt. Hierzu wurde eine Mikroskopie-basierte Methode verwendet, die es ermöglicht, sowohl fluoreszierende Bilder spezifischer MAPK aufzunehmen, als auch die Quantifizierung derselben. Da die Versuche in einem 96-Well Format durchgeführt werden können, ist es möglich, mehrere Messungen in kurzer Zeit durchzuführen, im Vergleich zur klassischen Western Blot Analyse. Aus diesem Grund wird eine *Medium-throughput* Methode zur Analyse von MAPK verwendet. In Anlehnung an die bereits bekannten Ergebnisse aus vorausgegangenen *in vitro* Versuchen und Western Blot Analysen wurden die Versuche geplant, durchgeführt und gegebenenfalls Veränderungen der einzelnen Versuchsschritte vorgenommen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen vorausgegangener Western-Blot-Analysen verglichen, um die Qualität der Daten zu beurteilen. Als bisher weitreichend untersuchte MAPK und zentraler Bestandteil der zuvor beschriebenen MAPK-Signalwege wurde für die ersten Analysen und zur Optimierung der Testmethode die MAPK ERK1/2 untersucht.

In Abbildung 3.8 sind die mikroskopischen Bilder der Aktivierung von ERK1/2 nach 1 und 8 Stunden Belastung mit 10 µg der Partikel dargestellt. Zur Identifizierung der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI eingefärbt und sind blau dargestellt. Rote Bereiche zeigen die Menge an phosphorylierter MAPK ERK1/2 (pERK1/2), welche für eine Aktivierung ERK1/2-spezifischer Signalwege steht. Für die Belastung mit NP ist sowohl nach 1, als auch nach 8 Stunden eine deutlichere Färbung von pERK1/2 zu sehen. Nach 8 Stunden ist für CP und fTiO₂ ebenfalls eine verstärkte Färbung im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

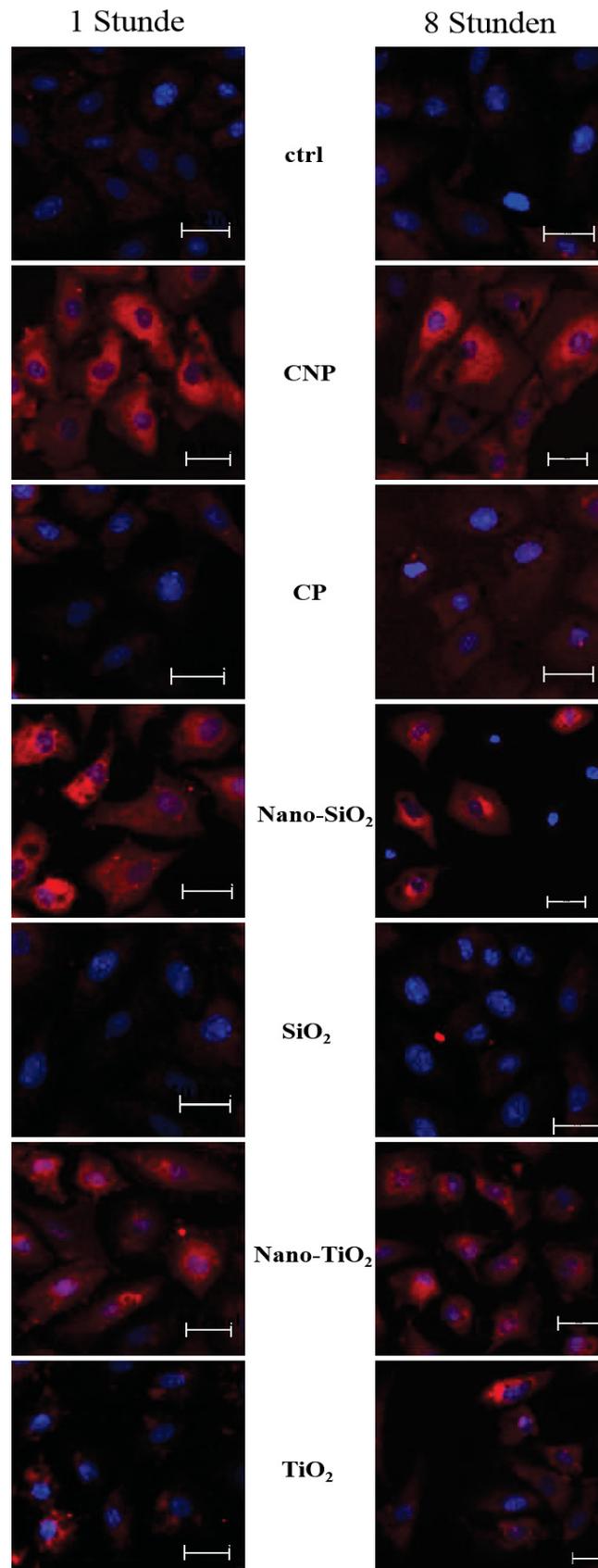


Abb. 3.8 Immunhistochemische Färbung von phospho-ERK1/2 in RLE-6TN-Zellen nach 1 und 8 Stunden Belastung: Die Zellen wurden für 1 bzw. 8 Stunden mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen behandelt. Dargestellt sind ausgewählte Bereiche gefärbter Zellen. Phospho-ERK1/2 = rot; DAPI = blau; Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$.

In Abbildung 3.9 A und B ist die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der zeitabhängigen, NP-spezifischen Aktivierung der MAPK ERK1/2 dargestellt. Abbildung 3.8 A zeigt die Menge an pERK1/2, ausgelöst durch die Partikel, nach einer Stunde. Im Vergleich zur Kontrolle ist ein Anstieg der Fluoreszenz, ausgelöst durch die NP zu sehen. Dieser Anstieg ist für Nano-Siliziumdioxid am stärksten auf ungefähr das 3-fache der Kontrolle. Die Erhöhung durch Nano-Titandioxid und CNP ist vergleichbar hoch und beträgt ungefähr das 2-fache der Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist durch die nicht-NP kein Unterschied zur Lösemittel-Behandlung zu erkennen. Einzig die Belastung durch CP zeigt eine leichte Erhöhung auf das 1,5-fache der Kontrolle, die allerdings nicht signifikant ist.

In einem isolierten Mann-Whitney-U-Test ist der Unterschied zwischen der Belastung mit ultrafeinen und feinen Partikeln für Silizium- und Titandioxid signifikant.

Auch nach 8 Stunden ist eine Erhöhung der Aktivierung von ERK1/2, ausgelöst durch die Nanopartikel, jedoch nicht durch die feinen Partikel zu erkennen (Abb. 3.9 B). CNP führt zu einer signifikanten Aktivierung und beträgt das 2,5-fache der Kontrolle. Nano-SiO₂ und Nano-TiO₂ verhalten sich ähnlich und erhöhen die ERK1/2-Phosphorylierung um das 2-fache im Vergleich zu PBS, wobei nur die Aktivierung durch Nano-TiO₂ signifikant ist. Die Belastung mit Titandioxid führt zu einer 1,4-fachen Erhöhung, die jedoch nicht signifikant ist.

In einem isolierten Mann-Whitney-U-Test ist der Unterschied zwischen den Nano und nicht-Nanopartikeln für Kohlenstoff, sowie Siliziumdioxid auch zu diesem Zeitpunkt signifikant.

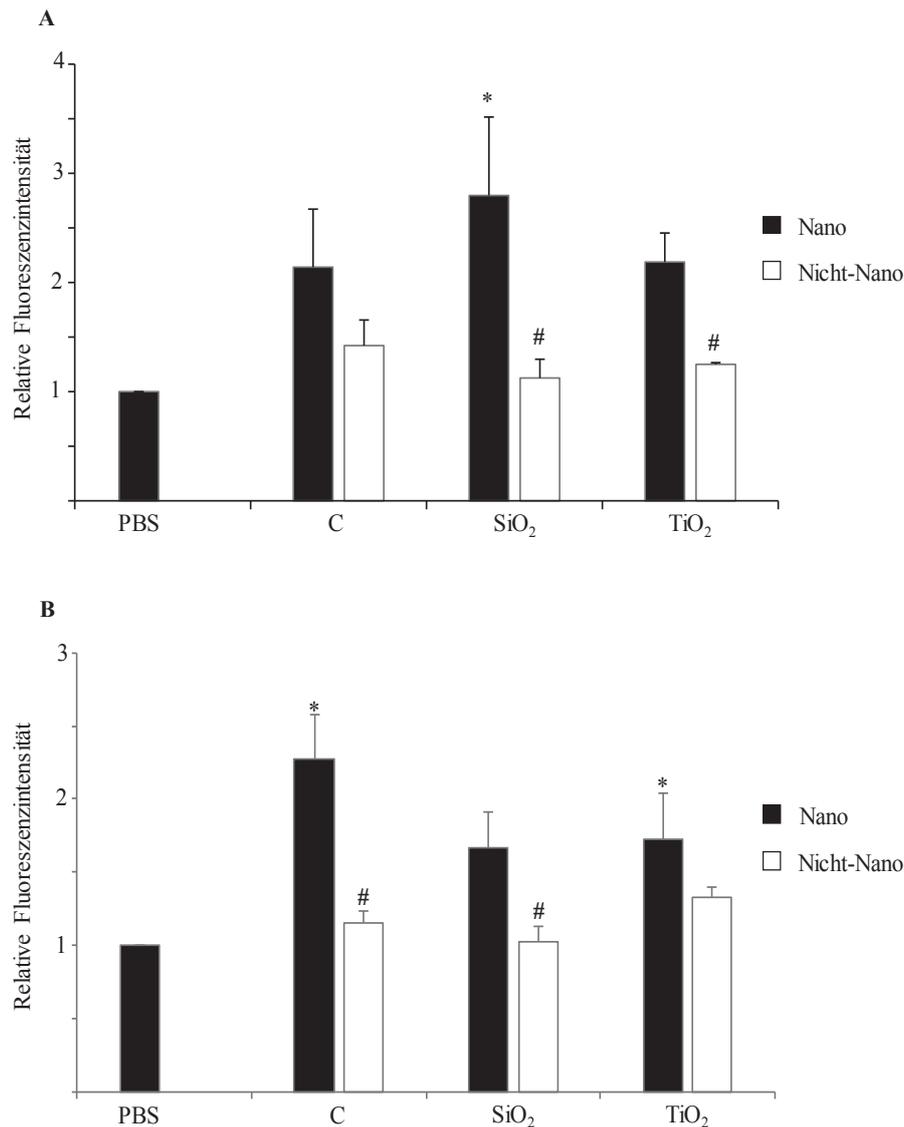


Abb. 3.9 Partikelinduzierte ERK1/2-Phosphorylierung nach 1 und 8 Stunden Belastung: RLE-6TN Zellen wurden für 1 bzw. 8 Stunden mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel behandelt. Die Auswertung zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler der relativen durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) nach 1 (n=3) (A) und 8 Stunden (n=8) (B) im Cellomics HCS ArrayScan in Bezug auf die entsprechende PBS-Kontrolle. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$); # signifikant unterschiedlich zum ultrafeinen Partikel (Mann-Whitney-U, $p < 0,05$).

In voraus gegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Nanopartikel-spezifische Aktivierung von ERK1/2 in Epithelzellen konzentrationsabhängig ist (Unfried et al., 2008). Zur Optimierung der Methode wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Zellen für 8 Stunden mit 1 bzw. $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mit den ultrafeinen und feinen Partikeln behandelt wurden.

In Abbildung 3.10 sind die mikroskopischen Bilder der konzentrationsabhängigen ERK1/2-Aktivierung zu sehen, aufgenommen mit dem Cellomics ArrayScan HCS Reader. Nach 8 Stunden erscheint die Färbung von pERK1/2 (rot) stärker durch die Belastung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der NP. Die nicht-NP scheinen zu einem leichten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zu führen, der augenscheinlich jedoch schwächer ist, als durch die Belastung mit NP.

Durch die Belastung mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist ebenfalls eine deutlichere Färbung durch die Belastung mit NP erkennbar, die jedoch schwächer erscheint, im Vergleich zur höheren Belastung. Für die nicht-NP ist nur noch eine geringfügig stärkere Färbung im Vergleich zur Kontrolle sichtbar.

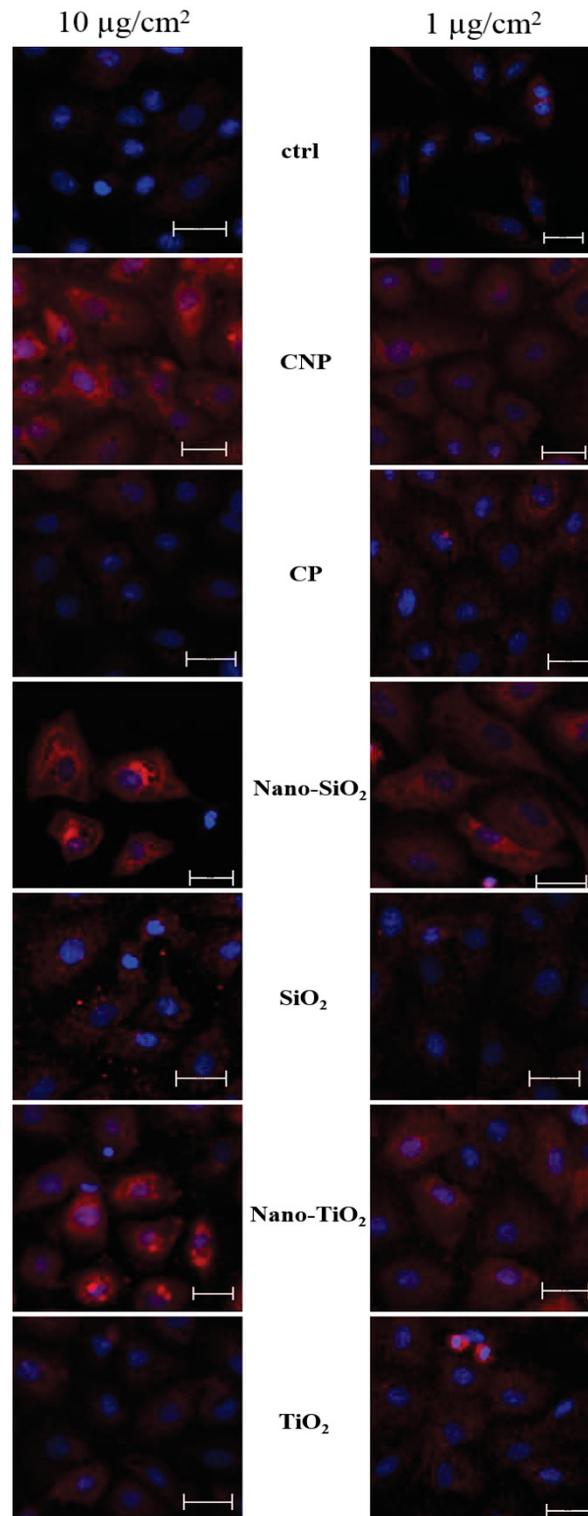


Abb. 3.10 Immunhistochemische Färbung von phospho-ERK1/2 in RLE-6TN-Zellen nach 8 Stunden Belastung mit 1 und $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$: Die Zellen wurden für 8 Stunden mit 1 bzw. $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen behandelt. Dargestellt sind ausgewählte Bereiche gefärbter Zellen. Phospho-ERK1/2 = rot; DAPI = blau; Maßstab entspricht $50 \mu\text{m}$.

In Abbildung 3.11 ist die Fluoreszenzintensität der Mikroskopiebilder quantifiziert und als Balkendiagramm dargestellt. Bei einer Belastung von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist der Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung ausgelöst durch die Nanopartikel zwischen 2 und 3-fach erhöht im Vergleich zur Kontrolle und für CNP und ultrafeines Titandioxid signifikant. Im Gegensatz dazu führen die nicht-Nanopartikel zu keinem signifikanten Anstieg.

Werden die Zellen nur mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der entsprechenden Partikel belastet, ist keine signifikante Erhöhung der Aktivierung von ERK1/2 zu sehen.

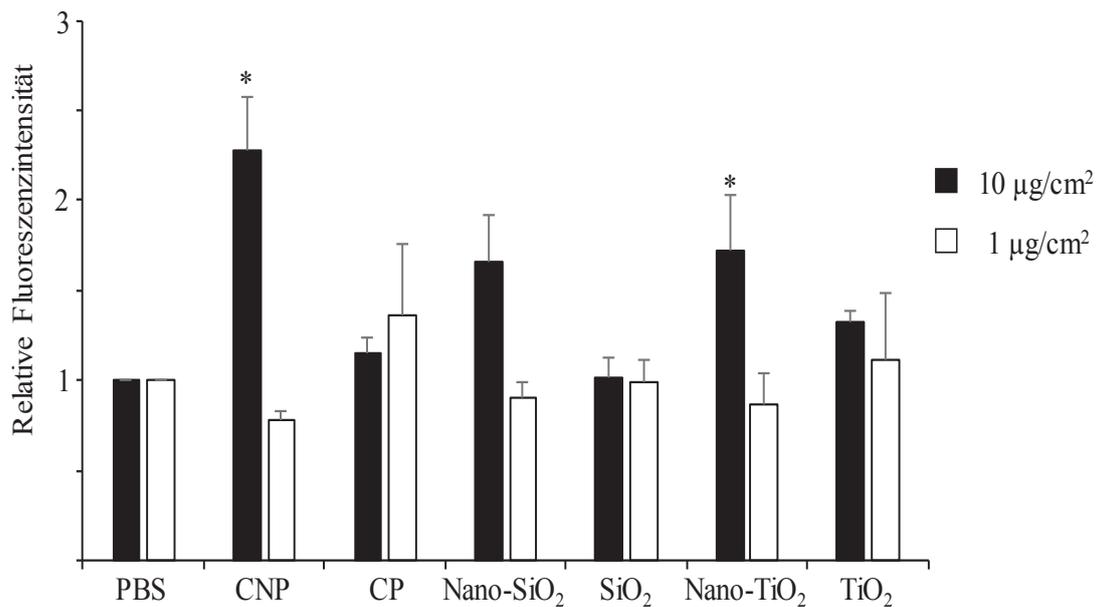


Abb. 3.11 Konzentrationsabhängige ERK1/2-Phosphorylierung nach 8 Stunden Belastung: RLE-6TN Zellen wurden für 8 Stunden mit 1 (n=3) bzw. $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (n=8) der Partikel behandelt. Die Auswertung zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler der relativen durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) nach 8 Stunden im Cellomics HCS ArrayScan in Bezug auf die entsprechende PBS-Kontrolle. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$);

Weissenberg et al. (2010) haben gezeigt, dass CNP in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, die für die Aktivierung verschiedener Signalwege, wie z.B. den EGFR-MAPK-Signalweg, relevant sind. Als erster Ansatz zur Bestimmung intrazellulärer ROS wurde versucht, eine Lebczell-Färbung zu etablieren, die die mikroskopische Darstellung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies, sowie deren Quantifizierung ermöglicht. Mit dem Farbstoff DCF (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein) konnten keine befriedigenden Ergebnisse erreicht werden. Mit dem Farbstoff DHE (Dihydroethidin) konnten erste Resultate erzielt werden, die einen Hinweis darauf geben, dass neben CNP auch Nano-SiO₂ und Nano-TiO₂ zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS führen.

In Abbildung 3.12 sind die mikroskopischen Bilder der DHE-Färbung dargestellt. Zellkerne wurden blau gefärbt, DHE erscheint rot. Durch die Belastung mit NP ist eine deutliche Verstärkung der DHE-Färbung zu sehen, die nahe des Zellkerns lokalisiert ist. Für die Belastung mit feinem Titandioxid ist eine geringfügig erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle erkennbar, für die anderen nicht-NP ist kein Unterschied sichtbar.

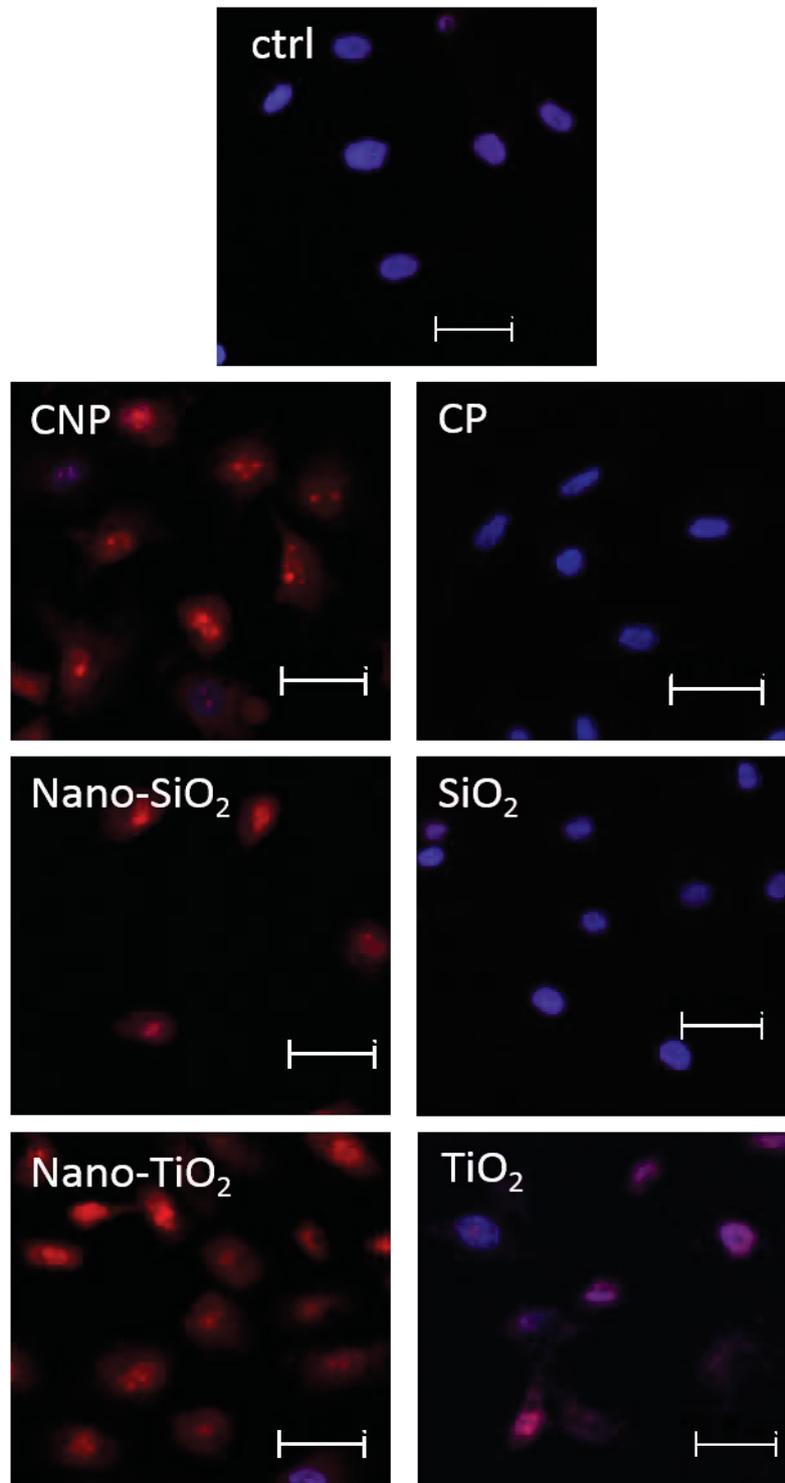


Abb. 3.12 Immunhistochemische Lebendzell-Färbung von DHE in RLE-6TN-Zellen nach 1 Stunde Belastung: Die Zellen wurden für 1 Stunde mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen behandelt. Dargestellt sind ausgewählte Bereiche gefärbter Zellen. DHE = rot; DAPI = blau; Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$.

In Abbildung 3.13 ist die Quantifizierung der intrazellulären Generierung von ROS, ausgelöst durch die Partikel, dargestellt. Da die Färbung mit DHE in lebenden Zellen durchgeführt wurde, wurden die Zellen nicht fixiert. Aus diesem Grund scheint die Fluoreszenz nicht in einer Ebene zu liegen, was eine quantitative Auswertung der Bilder zusätzlich erschwerte und eine Erklärung dafür sein könnte, dass die quantifizierten Werte eher niedrig ausfallen. CNP führt nach einer Stunde Belastung zu einem 1,6-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Nano-Siliziumdioxid generiert ungefähr 1,5-fach mehr ROS und Nano-Titandioxid führt zu einer 1,7-fachen Erhöhung der Superoxid-Produktion im Vergleich zur unbehandelten Probe. Für alle drei Nanopartikel ist dieser Anstieg signifikant. Die nicht-Nanopartikel führen zu keinem signifikanten Anstieg. In einem isolierten Mann-Whitney-U-Test ist der Unterschied zwischen Nano und nicht-Nano Titandioxid signifikant.

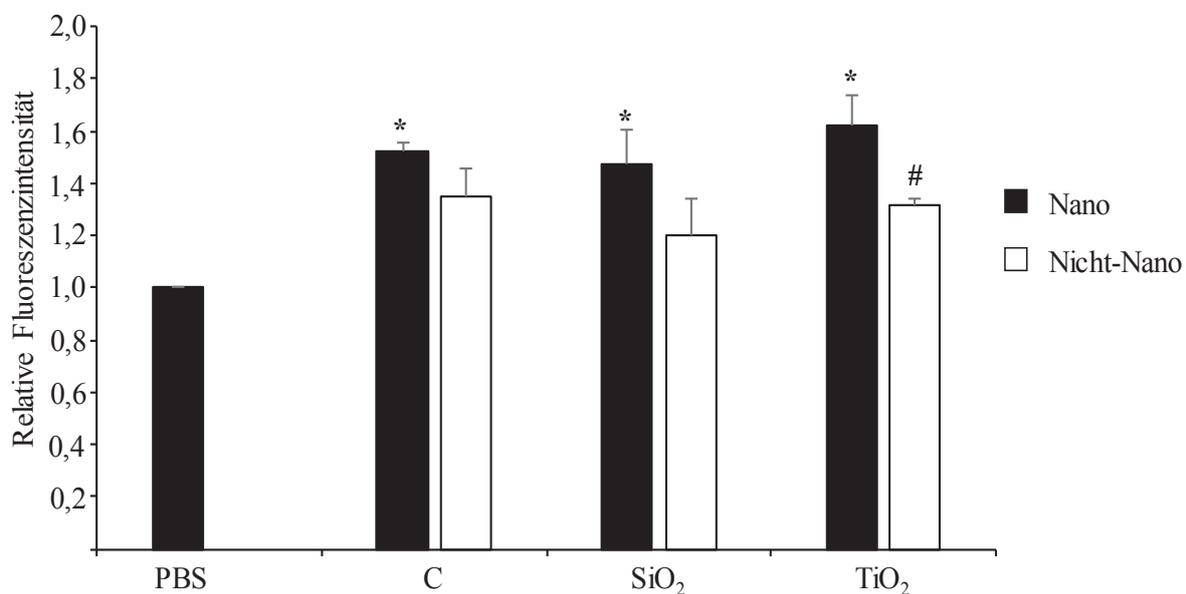


Abb. 3.13 Intrazelluläre Superoxid-Generierung nach Partikelbelastung: RLE-6TN wurden für 1 Stunde mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit DHE gefärbt und mikroskopisch mit Hilfe des Cellomics Array Scan HCS Readers untersucht und die Fluoreszenzintensität quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der relativen Fluoreszenzintensität von DHE bezogen auf die PBS-Kontrolle aus 3 unabhängigen Experimenten. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$); # signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung (Mann-Whitney-U, $p < 0,05$).

Für mechanistische Untersuchungen der MAPK-Aktivierung durch NP wurde in einem weiteren Versuch untersucht, welche Signalschritte zur Partikel-spezifischen Aktivierung von ERK1/2 führen. Zu diesem Zweck wurden spezifische Inhibitoren ausgewählt und den Zellen vor der Partikelbelastung zugesetzt (1 Stunde Vorinkubation). Anschließend erfolgte die Partikelbelastung für 8 Stunden. Als interne Kontrolle wurde hierzu der MEK-Inhibitor PD98059 verwendet, der die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert. Des Weiteren wurde Tocopherol als Antioxidans, sowie Erlotinib, als Tyrosin-Kinase-Hemmer zur Inhibierung der EGFR-Aktivierung verwendet.

Die Fluoreszenz-Bilder sind in Abbildung 3.14 dargestellt. In der ersten Spalte sind die belasteten Zellen ohne Vorbehandlung zu sehen. Wie schon in den voraus gegangenen Versuchen ist zu erkennen, dass die Färbung für pERK1/2 deutlicher erscheint durch Belastung mit den NP. Durch Vorbehandlung mit dem MEK-Inhibitor ist die Färbung nicht mehr so deutlich erkennbar, erscheint aber dennoch weiterhin erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Vorbehandlung mit Tocopherol ist nur noch bei CP und SiO₂ eine leichte Färbung zu sehen, für die NP ist augenscheinlich kein Unterschied zur Kontrolle feststellbar. Auch durch die Vorbehandlung mit Erlotinib ist eine verringerte Fluoreszenz im Vergleich zur Belastung mit NP allein wahrnehmbar.

Um den Einfluss der spezifischen Inhibitoren auf die Partikel-induzierte Aktivierung von ERK1/2 zu beurteilen, wurde die Fluoreszenzintensität der MAPK auf den mikroskopischen Bildern im Anschluss quantifiziert.

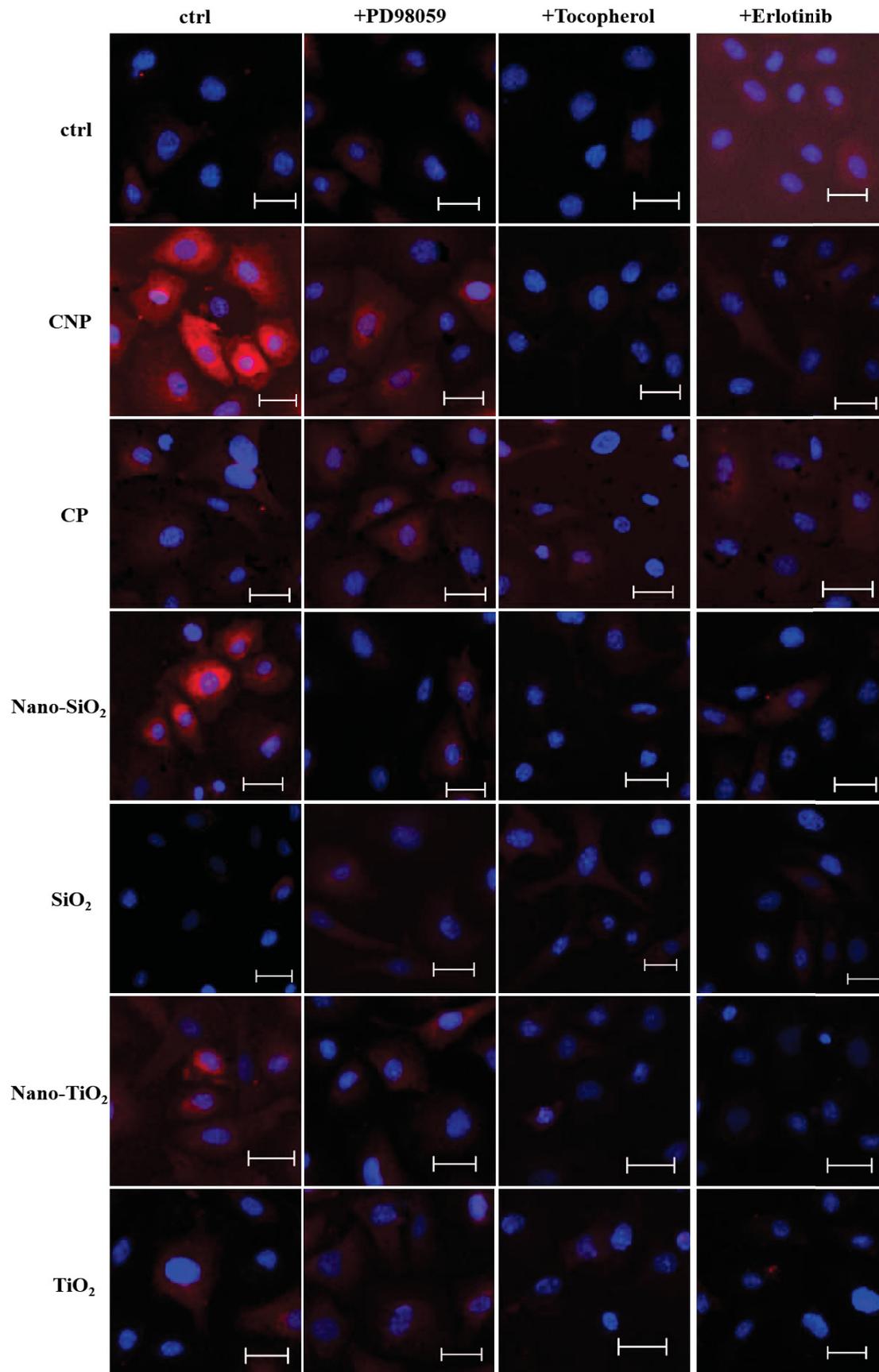


Abb. 3.14 Immunhistochemische Färbung von pERK1/2 in RLE-6TN-Zellen nach 8 Stunden Belastung: Die Zellen wurden für 1 Stunde mit 5 μM PD98059, 10 μM Tocopherol oder 10 μM Erlotinib vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Partikelbelastung für 8 Stunden mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dargestellt sind ausgewählte Bereiche gefärbter Zellen. Phospho-ERK1/2 = rot; DAPI = blau; Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

In Abbildung 3.15 ist die Quantifizierung der in 3.14 gezeigten Mikroskopie-Bilder dargestellt. Durch die Vorinkubation mit dem MEK-Inhibitor PD98059 ist die Aktivierung für alle Belastungen auf Kontrollniveau reduziert. Für die Belastung mit CNP, feinem Siliziumdioxid, sowie feinem Titandioxid ist dieser Rückgang in einem isolierten Man-Whitney-U-Test signifikant.

Zur Überprüfung der ROS-abhängigen Signaltransduktion wurden die Zellen im Voraus nach Peuschel et al. (2010) mit Tocopherol für eine Stunde vorinkubiert. Durch die Reduzierung der reaktiven Sauerstoffspezies kann ebenfalls die Aktivierung von ERK1/2 auf Kontrollniveau herab gesenkt werden. Die Differenz zur Kontrollgruppe ist nach Belastung mit ultrafeinem und feinem Siliziumdioxid, sowie ultrafeinem und feinem Titandioxid signifikant (Man-Whitney-U; $p < 0,05$).

Wie bereits von Sydlik et al. (2006) beschrieben wurde, ist die Aktivierung von ERK1/2, als spezifischer Marker der CNP-induzierten Proliferation, abhängig vom EGF-Rezeptor. In den aktuellen Arbeiten stellte sich die Frage, ob Siliziumdioxid und Titandioxid Nanopartikel ebenfalls rezeptorabhängig diesen Signalweg aktivieren, oder die Phosphorylierung von ERK1/2 über einen anderen Mechanismus verläuft. Zur Inhibierung des EGF-Rezeptors wurden die Zellen mit dem Tyrosinkinase-Hemmer Erlotinib vorbehandelt. Dieser blockiert spezifisch den EGFR und verhindert so die Aktivierung proliferativer Signalwege. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen mit den Partikeln belastet. Auch hier zeigt sich eine Reduktion der ERK1/2 Aktivierung, ausgelöst durch die Partikel. Die Fluoreszenzintensität sinkt auch hierbei für alle Partikelbelastungen auf das Niveau der unbehandelten PBS-Kontrolle. Mit Ausnahme von CP ist diese Reduzierung für alle Belastungen in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test signifikant im Vergleich zur nicht vorbehandelten Gruppe.

Somit scheint die Nanopartikel-spezifische Aktivierung von ERK1/2 nach 8 Stunden, sowohl ROS-abhängig, als auch EGFR-abhängig zu verlaufen.

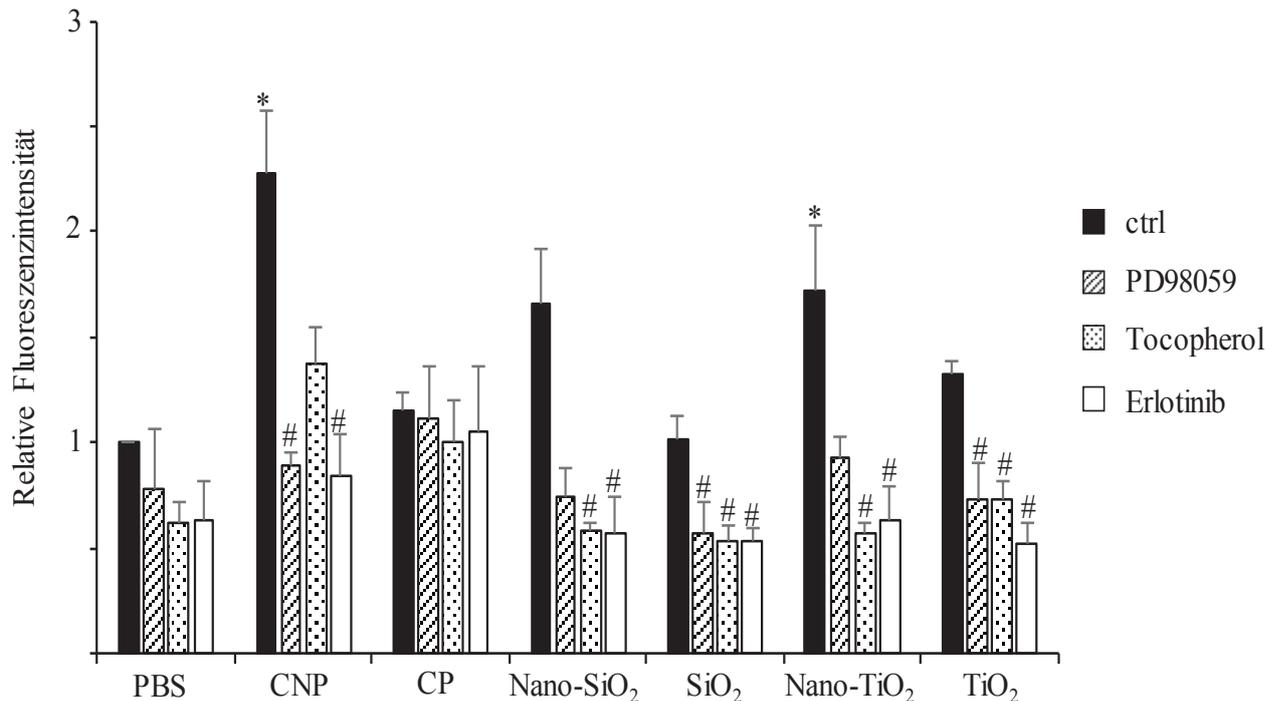


Abb. 3.15 Inhibierung der partikelinduzierten ERK1/2-Phosphorylierung nach 8 Stunden Belastung: RLE-6TN Zellen wurden für 8 Stunden mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel behandelt. Die Zellen wurden für eine Stunde mit $5 \mu\text{M}$ PD98059 (gestreift; $n=3$), $10 \mu\text{M}$ Tocopherol (gepunktet; $n=4$) oder $10 \mu\text{M}$ Erlotinib (weiß; $n=6$) vorbehandelt. Schwarze Balken = ohne Vorbehandlung ($n=8$). Anschließend erfolgte die Belastung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen. Die Auswertung zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler der relativen durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) nach 8 Stunden im Cellomics HCS ArrayScan in Bezug auf die entsprechende PBS-Kontrolle. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$); # signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung (Mann-Whitney-U, $p < 0,05$).

Zur internen Kontrolle wurde ein Vergleichsversuch mit einem Antikörper durchgeführt, der ERK1/2 unabhängig vom Phosphorylierungsstatus erkennt. Damit sollte überprüft werden, ob sich der totale Proteingehalt der MAPK durch die Belastung oder Vorbehandlung ändert und eventuelle Unterschiede darauf zurückzuführen sind. Die mikroskopischen Bilder sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Augenscheinlich sind keine deutlichen Unterschiede erkennbar. Die Fluoreszenz erscheint in allen Belastungen und Vorbehandlungen ähnlich zu sein. Um Unterschiede, die durch die rein visuelle Betrachtung möglicherweise nicht sichtbar sind, zu identifizieren, wurde die Fluoreszenzintensität zusätzlich quantifiziert.

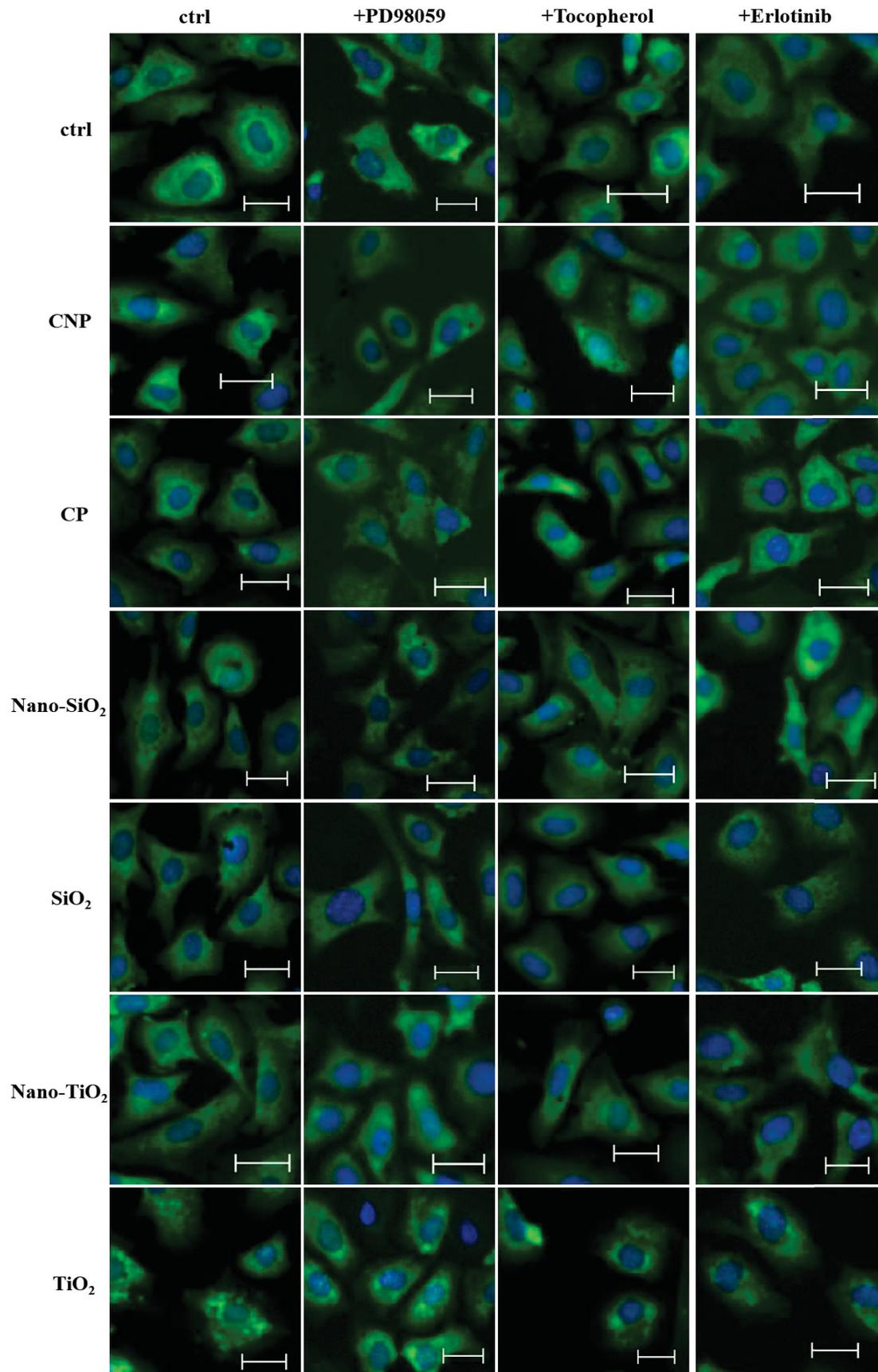


Abb. 3.16 Immunhistochemische Färbung von tERK1/2 in RLE-6TN-Zellen nach 8 Stunden Belastung: Die Zellen wurden für 1 Stunde mit 5 μM PD98059, 10 μM Tocopherol oder 10 μM Erlotinib vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Partikelbelastung für 8 Stunden mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dargestellt sind ausgewählte Bereiche gefärbter Zellen. Total-ERK1/2 = grün; DAPI = blau; Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

In Abbildung 3.17 ist die Quantifizierung des totalen Proteingehalts von ERK1/2 dargestellt. Für die Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung, sowie die Vorbehandlung mit Tocopherol und Erlotinib ist kein Unterschied zwischen den Belastungen zu erkennen. Lediglich für die Belastung mit TiO₂ ist ein leichter Anstieg in der Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung zu sehen. Für die Vorbehandlung mit PD98059 ist eine nicht signifikante Abnahme der Fluoreszenz-Intensität nach Belastung mit CP, nano-SiO₂, SiO₂ sowie nano-TiO₂ auf ca. 80% der Kontrolle zu beobachten.

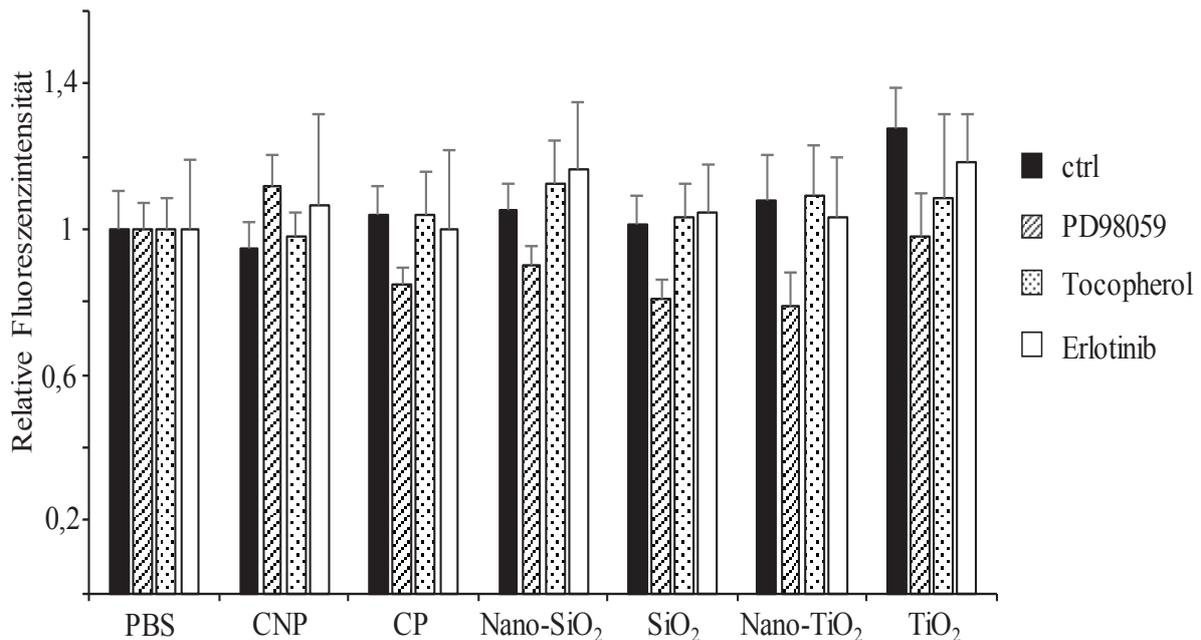


Abb. 3.17 Quantifizierung von tERK1/2 nach 8 Stunden Belastung: RLE-6TN Zellen wurden für 8 Stunden mit 10 µg/cm² der Partikel behandelt. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 5 µM PD98059, 10 µM Tocopherol oder 10 µM Erlotinib vorbehandelt. Schwarze Balken = ohne Vorbehandlung. Anschließend erfolgte die Belastung mit 10 µg/cm² der Partikelsuspensionen. Die Auswertung zeigt den Mittelwert ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist die relative durchschnittliche Fluoreszenzintensität von total-ERK1/2 (tERK1/2) nach 8 Stunden im Cellomics HCS ArrayScan in Bezug auf die entsprechende PBS-Kontrolle.

3.1.4. Membranabhängige, partikelinduzierte Signaltransduktion

Wie schon unter 3.1.3 gezeigt, lässt sich die partikelinduzierte Aktivierung von ERK1/2 mit Hilfe von Erlotinib inhibieren. Dies ist somit ein Hinweis darauf, dass die Partikel, insbesondere die Nanopartikel, diesen Signalweg über den EGF-Rezeptor aktivieren. Wird der EGFR aktiviert, transloziert er von der Zellmembran ins Zytoplasma und lässt sich dort mikroskopisch nachweisen. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Internalisierung zu einem frühen Zeitpunkt (5 Minuten) ausgelöst wird durch CNP, nicht aber durch CP (Peuschel et al., 2012). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass dieser Effekt spezifisch für Nanopartikel ist.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Nanopartikel aus dem Modellpartikel-System ebenfalls in der Lage sind, die EGFR-Translokation nach 5 Minuten Belastung zu aktivieren. In Abbildung 3.18 ist die immunhistochemische Färbung des EGFR in Epithelzellen dargestellt. In der PBS-Kontrolle ist deutlich zu erkennen, dass sich der EGFR in der Zellmembran befindet. Werden die Zellen mit EGF, dem natürlichen Liganden des EGFR behandelt, sieht man eine deutliche Internalisierung des Rezeptors.

Die deutlichste Translokation des EGFR in das Zellinnere ist zu sehen, wenn die Zellen mit CNP belastet werden. Es ist keine Färbung in der Zellmembran mehr zu sehen und die Färbung konzentriert sich sehr nah am Zellkern. Für die Belastung mit Nano-SiO₂ und Nano-TiO₂ ist ebenfalls eine Translokation zu sehen, die allerdings etwas diffuser ist, als durch CNP ausgelöst. Eine leichte Färbung in der Zellmembran ist für beide Belastungen noch zu sehen. Werden die Zellen mit den nicht-Nanopartikeln belastet, ist nur eine leichte bis keine Translokation des Rezeptors zu sehen. Für CP ist eine etwas stärkere Anreicherung nahe des Zellkerns wahrzunehmen, die Färbung in der Zellmembran ist dennoch deutlich vorhanden. Für die Belastungen mit SiO₂ und TiO₂ ergibt sich ein ähnliches Bild.

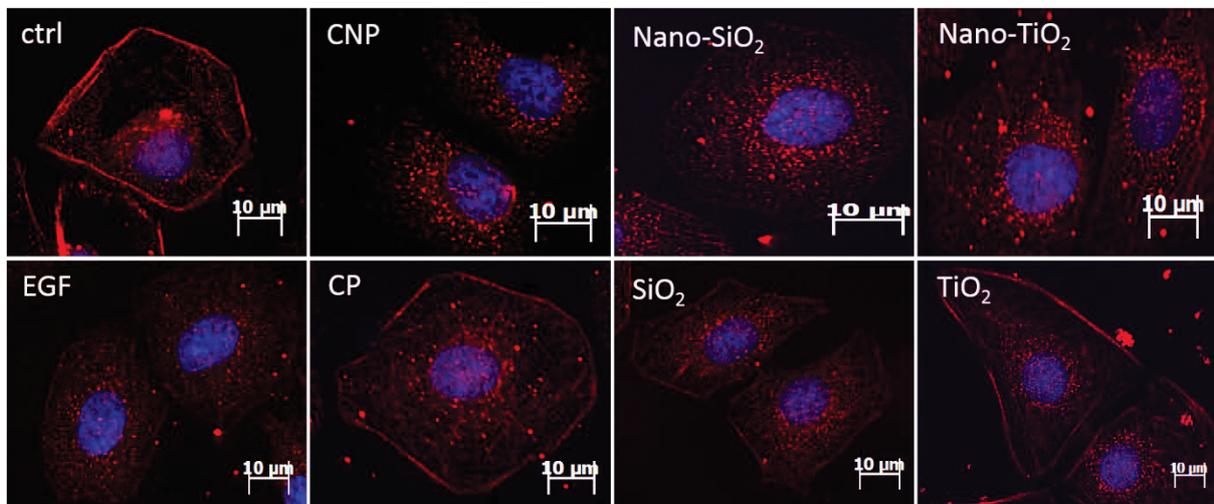


Abb. 3.18 Immunhistochemische Färbung des EGF-Rezeptors in RLE-Zellen nach 5 Minuten: RLE-6TN Zellen wurden für 5 Minuten mit 10 µg/cm² der Partikel behandelt. EGF (100 nM) diente als Positivkontrolle, PBS als Negativkontrolle. Die Lokalisation des EGFR (rot) wurde analysiert mittels Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

Wie bereits von der Arbeitsgruppe in Weissenberg et al. 2010 gezeigt, sind CNP in der Lage, zu einem frühen (5 Minuten) sowie einem späten Zeitpunkt (8 Stunden), die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 zu induzieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die c-src vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 zu beiden Zeitpunkten durch CNPs, nicht aber durch CPs ausgelöst wird (Peuschel et al., 2010). Somit besteht die Vermutung, dass die Internalisierung des EGFR ebenfalls zu einem späten Zeitpunkt durch Partikelbelastung ausgelöst werden kann.

In Abbildung 3.19 ist die Translokation des EGFR nach 8 Stunden Partikelbelastung dargestellt. In der Negativkontrolle, die nur mit PBS behandelt wurde, ist der EGFR in der Membran lokalisiert. In der Positivkontrolle, die mit EGF behandelt wurde, ist die Anreicherung des EGFR in der Nähe des Nukleus zu sehen. Für die Belastungen mit CNP, Nano-SiO₂, sowie Nano-TiO₂ ist eine deutliche Translokation zum Zellkern zu erkennen, die für CNP allerdings nicht so stark ausgeprägt ist, wie nach 5 Minuten (vgl. Abb. 3.17).

Für die Belastung mit Nano-TiO₂ ist die Färbung deutlich unscharf, was an einer Anreicherung der Partikel in der Zelle und dadurch eine Interaktion dieser mit der Fluoreszenz-Messung begründet sein kann. Ähnliches ist bei der Belastung mit TiO₂ zu sehen. Dennoch ist für die nicht-Nanopartikel zu sehen, dass sich der EGFR nach wie vor in der Zellmembran befindet und nur wenig bis gar keine Translokation stattgefunden hat.

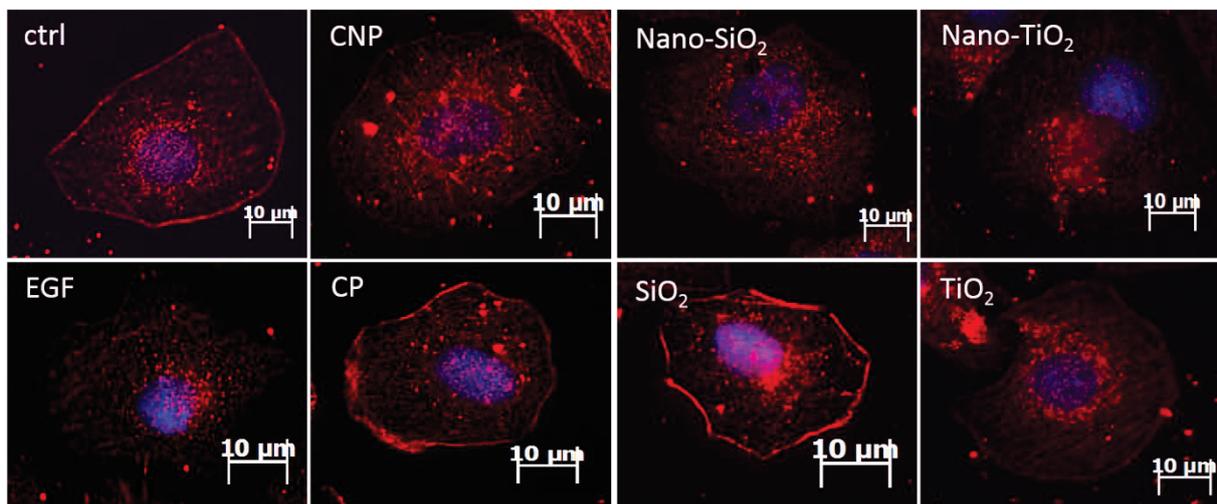


Abb. 3.19 Immunhistochemische Färbung des EGF-Rezeptors in RLE-Zellen nach 8 Stunden: RLE-6TN Zellen wurden für 8 Stunden mit 10 µg/cm² der Partikel behandelt. EGF (100 nM) diente als Positivkontrolle, PBS als Negativkontrolle. Die Lokalisation des EGFR (rot) wurde analysiert mittels Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

3.2. Moderne Nanomaterialien: Manganoxide

Zur mechanistischen Untersuchung der Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies wurden Mangan-NP unterschiedlicher Größe, Gestalt und Redox-Aktivität verwendet.

3.2.1. Partikelcharakterisierung

Die Partikel wurden am Institut Ruđer Bošković in Zagreb, Kroatien in der Abteilung Materialchemie bei Dr. M. Gotić synthetisiert und charakterisiert. Mit unterschiedlichen Synthese-Methoden war es möglich, Nanopartikel unterschiedlicher Größe, Gestalt und Oxidationsstufe herzustellen. Die SEM-Bilder der synthetisierten Partikel sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

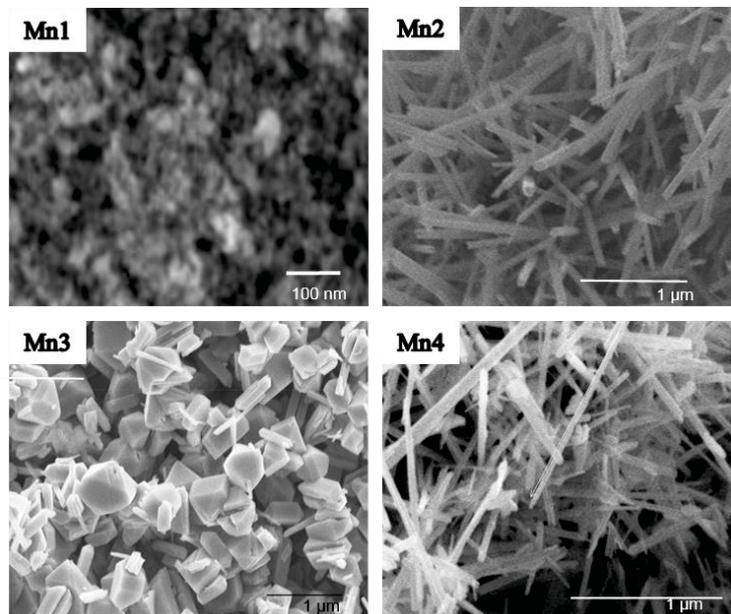


Abb. 3.20 Scanning-Electron-Microscopy-Aufnahmen von Manganoxid-Partikeln

Da aufgrund der geringen Ausbeute der Produkte eine BET-Messung nicht möglich war, wurde die theoretische Oberfläche aus den bekannten Parametern, sowie der Partikelform berechnet. Dabei wurde für Mn1 die Form einer Kugel, für Mn2 und Mn4 die eines Zylinders und für Mn3 die eines Würfels zugrunde gelegt. Basierend auf den erhaltenen Werten haben die stäbchenförmigen Partikel Mn2 und Mn4 ungefähr eine 4-fach größere Oberfläche, im Vergleich zum nicht-Nanopartikel Mn3. Mn1, der als Kugel die größtmögliche Oberfläche einnimmt, hat im Vergleich dazu eine mehr als 200-fach größere Oberfläche (Tabelle 3.1).

Mn2 und Mn4 besitzen einen primären Partikeldurchmesser von ungefähr 80 nm und sind somit per Definition auch Nanopartikel, obwohl ihre Länge bis zu 1,5 μm betragen kann. Mn1 ist der kleinste der 4 Partikel und mit einem primären Durchmesser von ungefähr 20 nm in Form und Größe ähnlich CNP.

Mn₃, mit einem Durchmesser von durchschnittlich 300 nm wird als nicht-Nanopartikel verwendet. Besonders hervorzuheben sind hierbei noch die unterschiedlichen Oxidationsstufen der Partikel. Mn₂, Mn₃ und Mn₄ bestehen aus Braunstein (MnO₂), somit hat das Mangan in den Partikeln eine Oxidationsstufe von +IV. Mn₁ besteht aus Hausmannit (Mn₃O₄) und besitzt somit 2 Oxidationsstufen, nämlich +II und +III.

Tab. 3.1 Eigenschaften der verwendeten Manganoxid-Nanopartikel

	Chemische Zusammensetzung	Primärer Partikeldurchmesser [nm]	Oxidations- stufen	Theoretische Oberfläche [m²/g]
Mn1	Mn ₃ O ₄	20	+II/+III	630
Mn2	MnO ₂	80	+IV	12
Mn3	MnO ₂	300	+IV	2,8
Mn4	MnO ₂	80	+IV	12

3.2.2. Einfluss von Manganoxiden auf die Viabilität von RLE-Zellen

Um spezifische, durch Nanopartikel ausgelöste Signalereignisse, von unspezifischen Effekten, die in Zusammenhang mit zytotoxischen Ereignissen auftreten, unterscheiden zu können, wurden zunächst Untersuchungen zur Zellviabilität durchgeführt. Dabei gibt es, neben dem Endpunkt Zelltod, unterschiedliche Zellorganellen, die von den Partikeln beeinflusst werden können. Zur genauen Identifizierung der zytotoxischen Eigenschaften der Partikel, wurden mehrere Versuche durchgeführt. Dazu wurde der Einfluss der Partikel auf die Zellmembran untersucht, sowie die Effekte auf die Integrität der Lysosomen und der Mitochondrienaktivität der Zellen.

Zunächst wurden unterschiedliche Konzentrationen der Partikel in einem Trypanblau-Assay gemessen, um den Einfluss auf die Membranintegrität zu untersuchen (Abb. 3.21). Durch die Belastung mit Mn₂ und Mn₃ ist eine Abnahme der Membranintegrität zu sehen, die jedoch nicht signifikant ist. Mn₁ und Mn₄ haben in keiner der gemessenen Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Membranintegrität, verglichen mit der PBS-behandelten Gruppe.

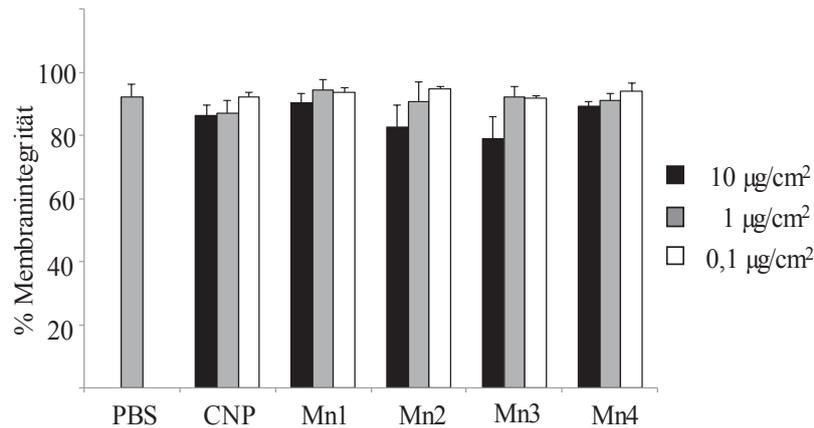


Abb. 3.21 Messung der Membranintegrität von Zellen nach Belastung mit Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 4 Stunden mit 0,1; 1 und 10 µg/cm² der Partikelsuspensionen belastet. Gemessen wurde der prozentuale Anteil Trypanblau-positiver Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte vitaler Zellen ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten.

Da es möglich ist, dass die Partikel keinen Einfluss auf die Zellmembran haben, aber trotzdem Zellorganellen angreifen und schädigen können, wurden weitere Assays zur Untersuchung der Aktivität verschiedener Zellorganellen durchgeführt. Zunächst wurde die Lysosomenaktivität untersucht und ein Neutralrot-Assay durchgeführt. Die Menge an aufgenommenem Neutralrot ist ein Marker für die Intaktheit der Lysosomen-Membran. In Abbildung 3.22 sind die Ergebnisse der Messung nach 4 Stunden Belastung mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen dargestellt. Für keine der Belastungen ist eine Abnahme der Lysosomen-Aktivität sichtbar. In der niedrigeren Konzentration von 5 µg/cm² ist sogar ein Anstieg der Lysosomenaktivität zu sehen.

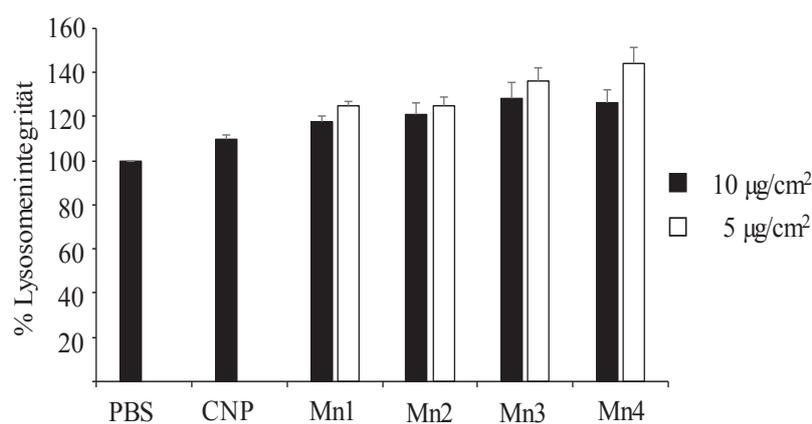


Abb. 3.22 Messung der Lysosomen-Integrität von Zellen nach Belastung mit Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 4 Stunden mit 0,1; 1 und 10 µg/cm² der Partikelsuspensionen belastet. Gemessen wurde der prozentuale Anteil Trypanblau-positiver Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten.

Als dritter Versuch zur Untersuchung der Zellviabilität wurde ein WST-1-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen für 4 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen belastet. In Abbildung 3.23 ist die metabolische Aktivität in Abhängigkeit von der Partikel-Konzentration abgebildet. Für CNP ist für keine der Konzentrationen zwischen 0,0001 und 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Abnahme der metabolischen Aktivität zu sehen. Im Gegensatz dazu führt die Belastung mit Manganoxid-Partikeln zu einer drastischen Reduzierung. Bestimmt man aus den erhaltenen Kurven den EC_{50} der Partikel, so ergibt sich die höchste Zytotoxizität für Mn2 und Mn4 (0,4 bzw. 0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Mn3 führt bei einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu 50% Reduzierung der metabolischen Aktivität. Für Mn1 liegt dieser Wert bei 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

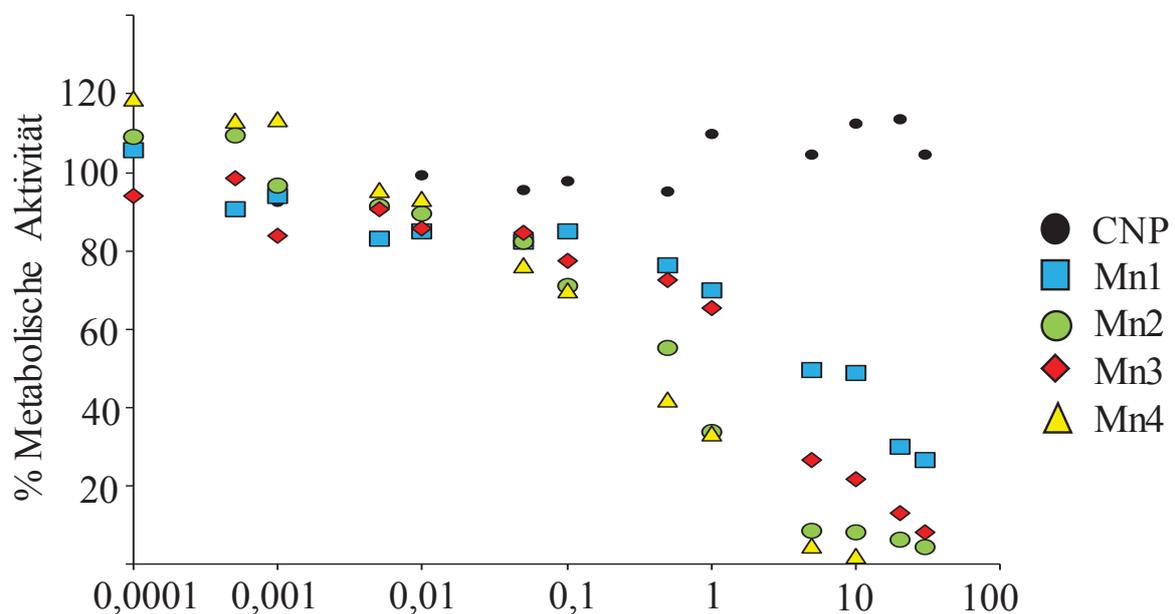


Abb. 3.23 Konzentrationsabhängige metabolische Aktivität von Zellen nach Belastung mit Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 4 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Partikelsuspensionen belastet. Der Gehalt an Formazan wurde colorimetrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-6 unabhängigen Experimenten.

3.2.3. Partikelaufnahme

3.2.3.1. Granularität in vitalen Zellen

Da die Partikel, wie in 3.2.2 gezeigt, keinen Einfluss auf die Intaktheit der Zellmembran haben, aber Effekte in einzelnen Zellorganellen auslösen können, liegt die Vermutung nahe, dass die Partikel ins Innere der Zelle vordringen können. Dazu sind verschiedene Mechanismen möglich. Aufgrund ihrer geringen Größe könnten die Partikel theoretisch die Zellmembran penetrieren. Sie können jedoch auch über verschiedene endozytotische Prozesse über die Membran in die Zelle aufgenommen werden. Werden die Zellen bei 4°C gehalten, wird der Energiehaushalt der Zelle reduziert und es kann keine Endozytose mehr stattfinden. Die endozytotische Aufnahme der Partikel in die Zelle sollte somit unterbunden sein.

Da es nicht möglich war, die Partikel fluoreszent zu markieren und so mikroskopisch ihre Aufnahme in die Zellen zu verfolgen, wurde die Granularität der Zellen als erster Hinweis auf eine mögliche Partikelaufnahme herangezogen.

In Abbildung 3.24 sind die durchflusszytometrischen Untersuchungen in einem Balkendiagramm dargestellt. Die relative Partikelaufnahme wurde aus dem Wert des *Side Scatter*, als Maß für die Granularität der Zellen, relativ zur PBS-Kontrolle berechnet. Sie ist ein Maß für die Streuung der Zellen entlang der y-Achse, die in den entsprechenden *DotPlots* unter dem Balkendiagramm für die Belastung bei 37°C dargestellt ist. Bei 37°C erkennt man für alle Belastungen eine Aufnahme der Partikel in die Zelle. Mn1, als kleinster Partikel führt zu einer Verdopplung der Granularität. Mn3 und Mn4 verhalten sich ähnlich und führen zu einer 1,8-fachen Granularitäts-Zunahme. Für Mn2 steigt dieser Wert nur auf das 1,5-fache der Kontrolle an. Alle Werte sind signifikant erhöht im Vergleich zur PBS-Kontrolle. In den *DotPlots*, die unter dem Diagramm abgebildet sind, ist zu erkennen, dass die Streuung der Zellen entlang der y-Achse nach Partikelbelastung zunimmt, die Streuung entlang der x-Achse dahingegen nahezu unverändert ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Granularität der Zellen verändert, nicht aber die Größe.

Werden die Zellen bei 4°C gehalten und dann belastet, sinkt die Granularität für Mn2, Mn3 und Mn4 auf ca. das 1,2-fache der Kontrolle ab. Für diese Partikel ist der Unterschied zur Kontrolle nicht signifikant. Für die Belastung mit Mn1 ist nur ein leichter Rückgang auf das 1,7-fache der Kontrolle im Vergleich zur 37°C-Belastung zu sehen, die dennoch in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test signifikant reduziert ist. Auch für die anderen 3 Partikel ist der Rückgang der Partikelaufnahme bei 4°C in isolierten Mann-Whitney-U-Tests signifikant reduziert im Vergleich zur 37°C-Belastung.

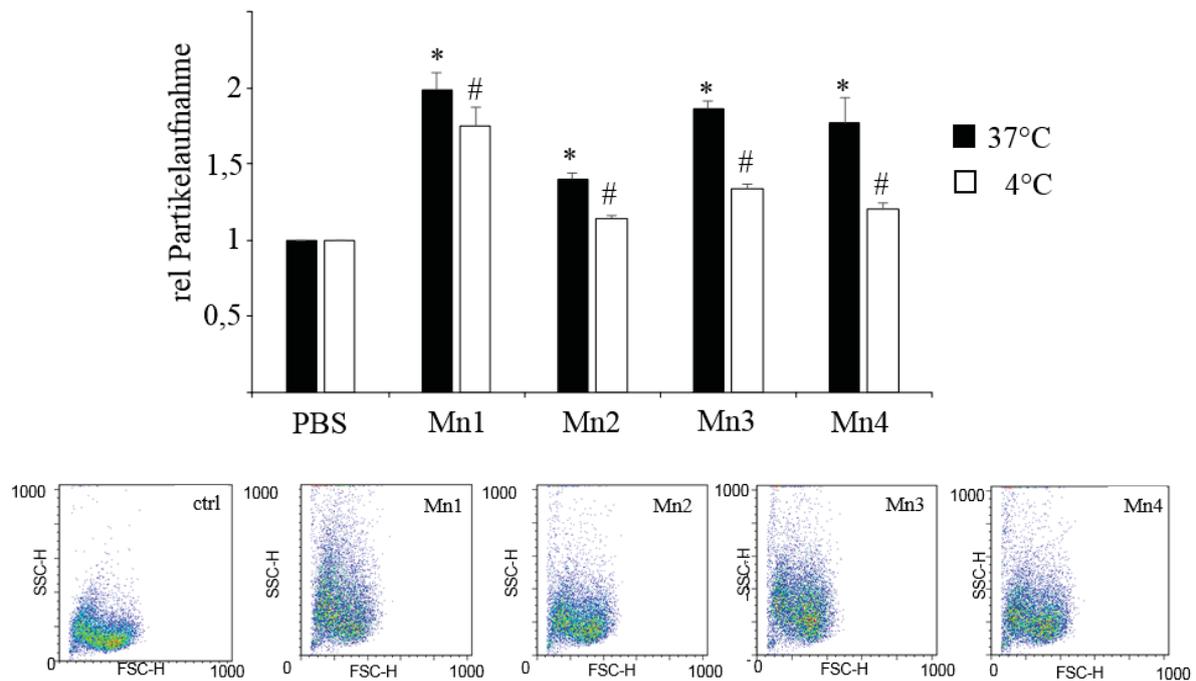


Abb. 3.24 Temperaturabhängige Granularität von Zellen nach Belastung mit Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 4 Stunden mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen belastet. Die Zellen wurden in dieser Zeit unter Normalbedingungen bei 37°C , oder bei 4°C gehalten. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und der Wert des side scatters als Maß für die Granularität und damit Aufnahme der Partikel bestimmt. Alle Werte sind relativ auf die PBS-Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6-9 unabhängigen Experimenten. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$); # signifikant unterschiedlich zwischen den Behandlungen (Mann-Whitney-U, $p < 0,05$). Zusätzlich gezeigt sind repräsentative *DotPlots* der Partikelbelastungen bei 37°C .

Wie in Kapitel 1.5 erklärt, gibt es verschiedene Arten der Endozytose. Diese können mit spezifischen Inhibitoren unterbunden werden. Im nachfolgenden Versuch wurden die Zellen mit Filipin vorbehandelt, einem spezifischen Inhibitor der Caveolin-abhängigen Endozytose. Die Zellen wurden mit 2 verschiedenen Konzentrationen, 0,5 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Filipin für 30 Minuten vorbehandelt. Höhere Konzentrationen wurden ebenfalls verwendet, führten jedoch zu einer zu starken Permeabilisierung der Zellmembran und somit zum Absterben der Zellen. In Abbildung 3.25 ist die relative Zellgranularität nach 4 Stunden Partikelbelastung dargestellt.

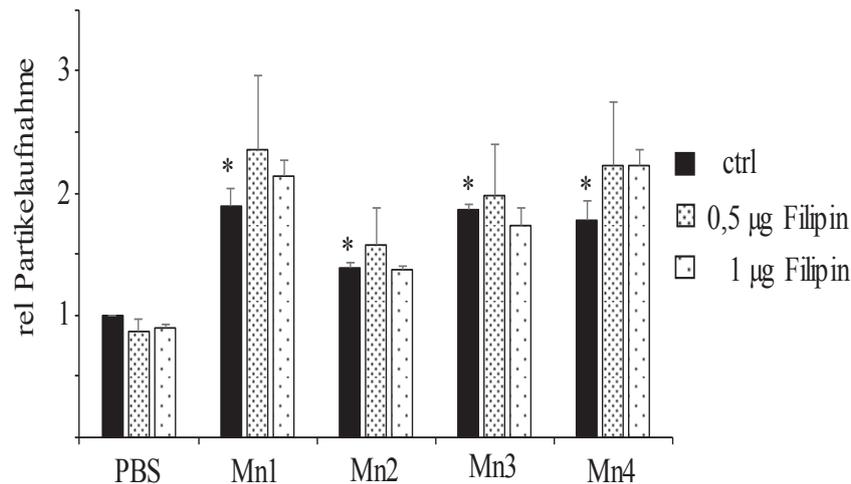


Abb. 3.25 Caveolin-abhängige Zellgranularität nach Belastung mit Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 30 Minuten mit 0,5 bzw. 1 µg/ml Filipin vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Partikelbelastung für 4 Stunden mit 5 µg/cm². Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und der Wert des side scatters als Maß für die Granularität und damit Aufnahme der Partikel bestimmt. Alle Werte sind relativ auf die PBS-Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-9 unabhängigen Experimenten. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$)

In der oben gezeigten Abbildung ist zu sehen, dass die Partikelaufnahme, bzw. Granularität der Zellen nicht verändert wird durch Vorbehandlung mit Filipin. Die Granularität mit Vorbehandlung ist vergleichbar mit der Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Für keine der gewählten Konzentrationen ist eine signifikante Abnahme der Granularität zu beobachten.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit Cytochalasin D vorbehandelt, um eine Aktinfilament-abhängige Endozytose zu inhibieren. Die Zellen wurden mit 1 bzw. 5 µg/ml Cytochalasin D für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend mit den Partikeln belastet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

Für die Vorbehandlung mit 1 µg/ml Cytochalasin D ist nach Belastung mit Mn1, Mn3 und Mn4 eine Abnahme der Granularität zu sehen, die jedoch nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu zeigt die Vorbehandlung mit 5 µg/ml eine signifikante Reduktion der Partikelaufnahme für die Belastung mit Mn2, Mn3 und Mn4. Für Mn2 sinkt sie nur sehr gering von 1,5 auf 1,4 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, Für Mn3 und Mn4, für die der Wert in der unbehandelten Kontrolle bei ca. 2-fach erhöhter Aufnahme liegt, sinkt dieser durch die Vorinkubation mit Cytochalasin D auf 1,5 für Mn3 und 1,4 für Mn4. Für die Belastung mit Mn1 ist eine Abnahme von 1,9 auf 1,7 zu beobachten, die jedoch nicht signifikant ist.

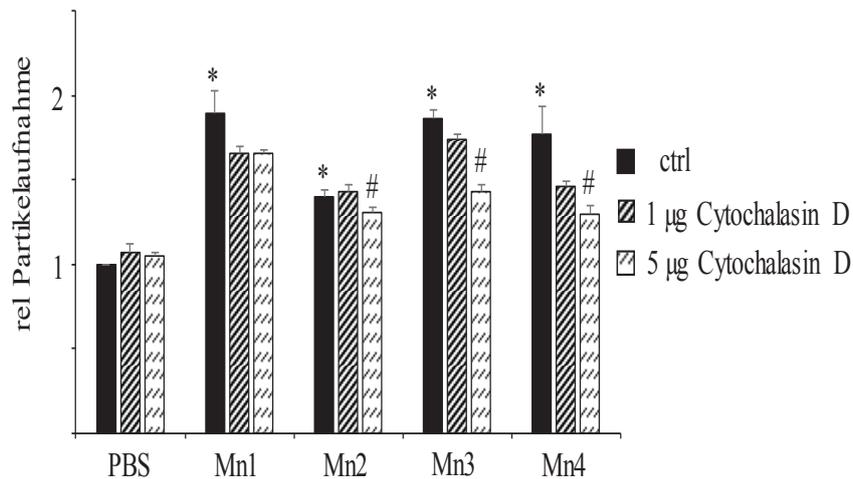


Abb. 3.26 Aktin-abhängige Aufnahme von Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 30 Minuten mit 1 bzw. 5 µg/ml Cytochalasin D vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Partikelbelastung für 4 Stunden mit 5 µg/cm². Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und der Wert des side scatters als Maß für die Granularität und damit Aufnahme der Partikel bestimmt. Alle Werte sind relativ auf die PBS-Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-9 unabhängigen Experimenten ± Standardfehler. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$) # signifikant unterschiedlich zur Lösemittelkontrolle (Mann-Whitney-U, $p < 0,05$).

3.2.4. Partikelinduzierte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Wie bereits von Weissenberg et al. (2010) gezeigt, sind Partikel in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu generieren. Dies kann intrazellulär, aufgrund von Wechselwirkungen mit Zellbestandteilen stattfinden, allerdings ist auch eine Generierung der Partikel selbst an ihrer Oberfläche möglich. Da Mangan zu den Transitionsmetallen gehört und nah verwandt ist mit Eisen, besteht die Vermutung, dass die metallische Komponente der Manganoxid-Partikel in der Lage ist, in einer Fenton-Reaktion reaktive Sauerstoffspezies an der Partikeloberfläche zu bilden. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst ein zellfreier DCF-Assay durchgeführt, um die Redox-Aktivität der Partikel zu bestimmen.

In Abbildung 3.27 ist die Fenton-Reaktivität der Partikel in Anwesenheit von H₂O₂ zu den Zeitpunkten 0, 14 und 30 Minuten dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 ist noch kein Anstieg der Fluoreszenz für alle Belastungen zu erkennen. Nach 14 Minuten ist die Fluoreszenz in der Kontrolle auf das 6-fache angestiegen, nach 30 Minuten beträgt sie das 11-fache des Ausgangswertes. Für CNP ist dieser Anstieg deutlicher, nach der Hälfte der Zeit liegt er bei dem 15-fachen der Kontrolle und endet nach 30 Minuten bei einem 25-fach stärkeren Anstieg. Für beide Zeitpunkte ist der Unterschied zur PBS-Kontrolle zum selben Zeitpunkt signifikant. Für Mn1 ist kaum ein Unterschied zur Kontrolle zu sehen. Nach 14 Minuten beträgt die Fluoreszenz ebenfalls das 6-fache des Ausgangswertes, nach 30 Minuten ist dieser Wert 15-fach erhöht, beide Werte sind nicht signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle.

Mn2 und Mn4 verhalten sich relativ ähnlich zueinander. Nach 14 Minuten ist für beide ein 14-facher Anstieg der Fluoreszenz messbar, nach 30 Minuten beträgt dieser für Mn2 das 37-fache, für Mn4 das 40-fache der Kontrolle. Für beide Partikel ist dieser Anstieg zu beiden Zeitpunkten signifikant. Mn3 führt zu einer vergleichbaren Erhöhung der ROS-Generierung, wie CNP. Nach 14 Minuten ist der Wert um das 10-fache erhöht, nach 30 Minuten um das 26-fache. Auch für Mn3 sind beide Werte signifikant erhöht im Vergleich zur PBS-Kontrolle.

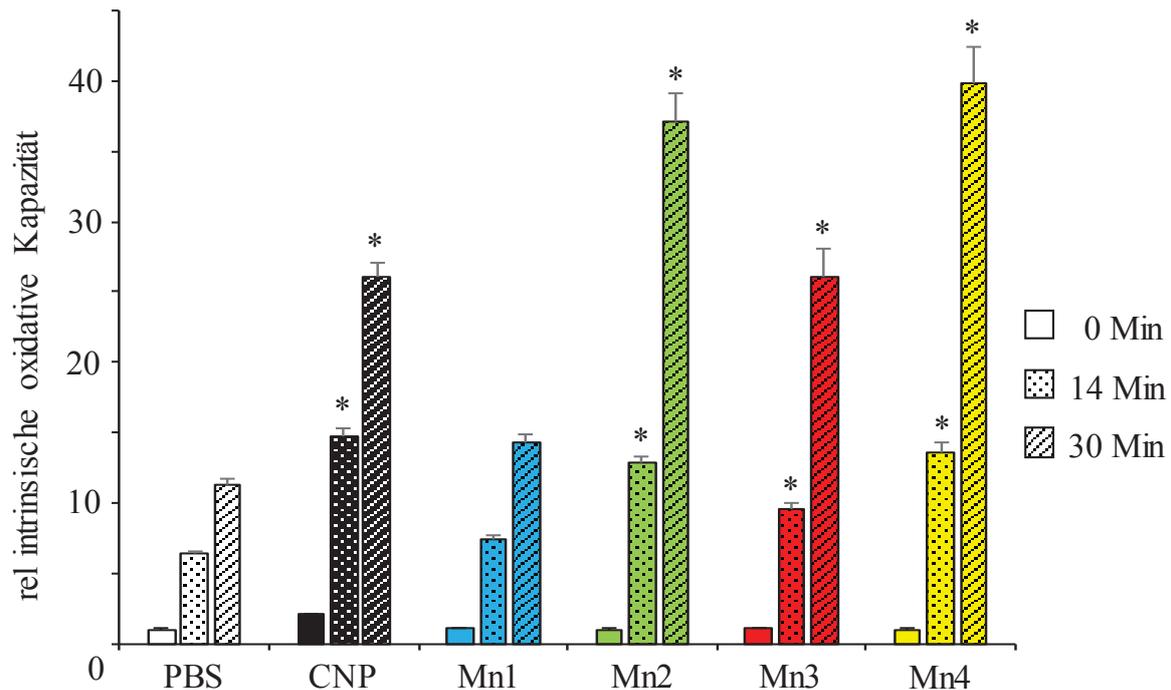


Abb. 3.27 Zeitabhängige ROS-Generierung von Manganoxid im zellfreien System: 16 $\mu\text{g/ml}$ der Partikelsuspensionen ($= 5 \mu\text{g/cm}^2$) wurden in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von DCF. Die Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten zu den Zeitpunkten 0, 14 und 30 Minuten \pm Standardfehler. Alle Werte sind relativ auf die PBS-Kontrolle zum Zeitpunkt $t=0$ bezogen. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle zum Zeitpunkt $t=0$ (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$).

In einem weiteren Versuch wurde die intrazelluläre Generierung von ROS durch die Belastung mit Partikeln untersucht. In Abbildung 3.28 ist die konzentrationsabhängige Generierung von ROS nach 30 Minuten dargestellt. Für die Mangan-Nanopartikel Mn1, Mn2 und Mn4 ist ein dosisabhängiger Anstieg des intrazellulären ROS-Levels zu erkennen. Für die Konzentration von $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ steigt die intrazelluläre ROS-Generierung auf das 3-fache an, für Mn2 auf das doppelte. Mn3 führt zu keinerlei Erhöhung in dieser Konzentration und für Mn4 steigt der Wert sogar auf das 4-fache der Kontrolle an. Für keinen der Partikel ist dieser Anstieg signifikant.

Werden die Zellen mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ belastet, steigt die intrazelluläre ROS-Generierung für CNP, Mn1, sowie Mn2 auf das 6-fache der Kontrolle an. Für die Mangan-Partikel ist dieser Anstieg signifikant.

Mn3 führt wiederum zu keiner signifikanten Erhöhung, wohingegen Mn4 eine 12-fach höhere ROS-Generierung im Vergleich zur PBS-Kontrolle verursacht. Für die höchste Belastung von $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ steigt das ROS-Level für Mn1 und Mn2 ungefähr auf das 8,5-fache, für Mn4 auf das 14-fache der Kontrolle an. Für alle 3 Partikel ist dieser Anstieg signifikant. Mn3 führt zu einem nicht signifikanten Anstieg der Fluoreszenz auf das doppelte der Kontrolle.

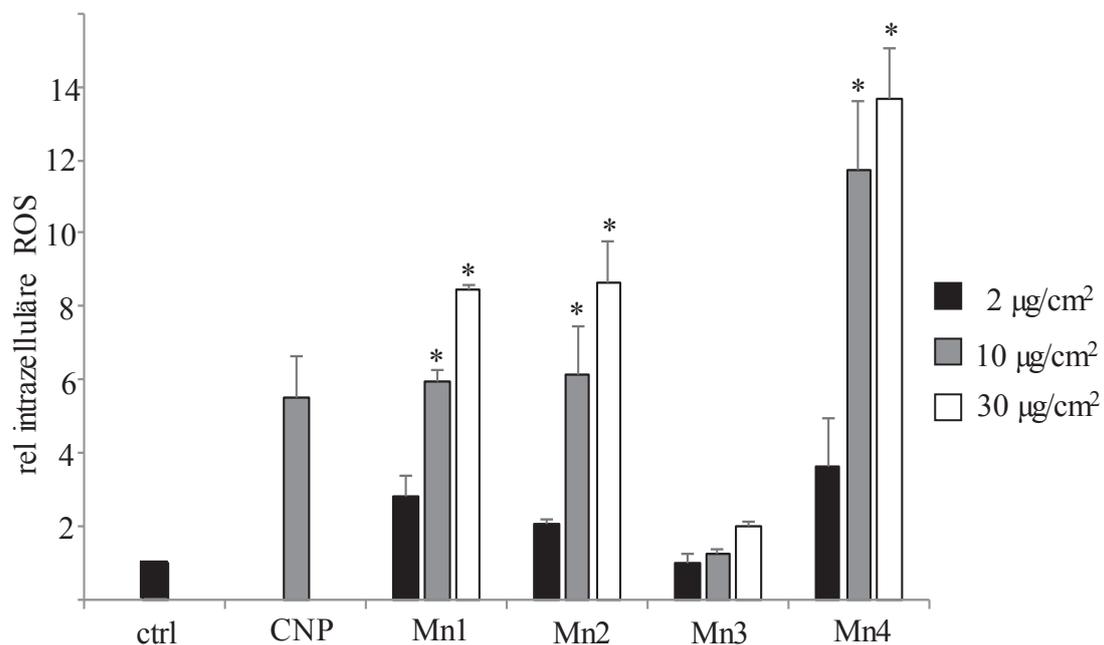


Abb. 3.28 Konzentrationsabhängige intrazelluläre ROS-Generierung von Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 30 Minuten mit 2, 10 und $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Partikeln behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von DCF-DA. Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Alle Werte sind relativ auf die PBS-Kontrolle bezogen. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$).

Da der Farbstoff H₂DCF-DA nicht spezifisch für bestimmte ROS ist, wurden weitere Tests zur Untersuchung spezifischer Sauerstoffspezies durchgeführt. In einer Studie von Li et al. (2003) wurde gezeigt, dass durch Belastung mit NP und einem vermehrten Auftreten von ROS die Mitochondrien zerstört werden können. Aufgrund dieser Vorkenntnisse und der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2. besteht die Vermutung, dass die Manganoxid-Partikel ebenfalls einen schädigenden Einfluss auf die Mitochondrien haben können. Aus diesem Grund wurden zunächst die mitochondriell generierten Superoxid-Anionen mit dem Farbstoff MitoSox Red durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 3.29).

Die Generierung von Superoxid-Anionen in den Mitochondrien wird von den Manganoxid-Partikeln reduziert. Für Mn1 ist diese Reduktion auf ca. 60% der Kontrolle nicht signifikant. Durch die Belastung mit Mn2 und Mn4 wird die Superoxid-Generierung signifikant auf ca. 30% der Kontrolle gesenkt. Für Mn3 ist dieser Rückgang am stärksten und beträgt nach 4 Stunden Belastung noch 20%. Auch für Mn3 ist der Rückgang signifikant.

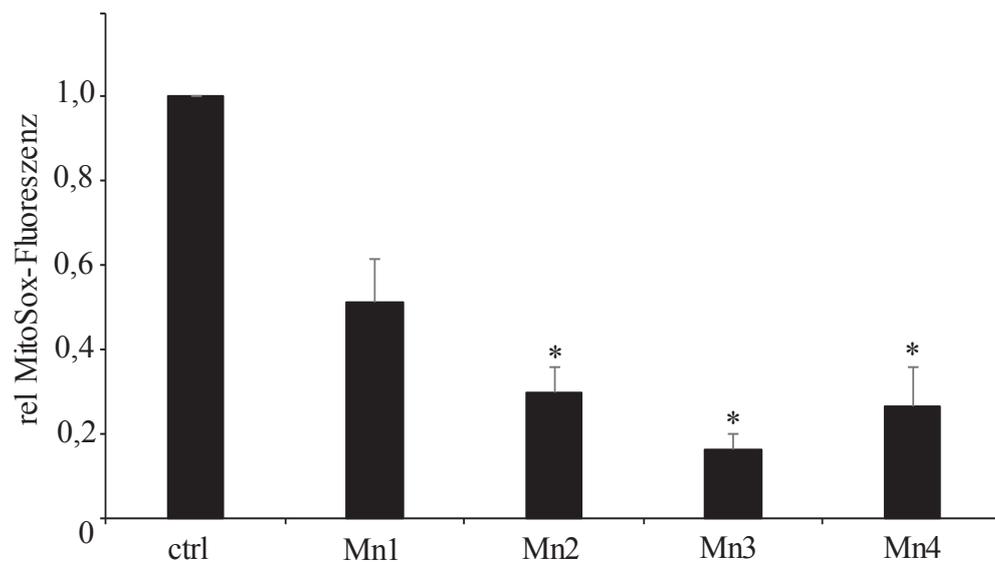


Abb. 3.29 Partikelinduzierte Generierung mitochondrieller Superoxid-Anionen: RLE-6TN wurden für 4 Stunden mit 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel belastet. PBS diente als Negativkontrolle. Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus 5 voneinander unabhängigen Experimenten. Alle Werte sind relativ auf die PBS-Kontrolle bezogen. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$)

3.2.5. Partikelinduzierte Signaltransduktion mittels Western Blot-Methode

Zur weiteren Untersuchung der Effekte der Partikel auf zelluläre Ereignisse wurden zunächst mit Hilfe der Western-Blot Methode zwei Vertreter für die partikelinduzierte Aktivierung von Signalwegen analysiert. Phospho-ERK1/2 wurde als Marker für proliferative Signalwege untersucht. Die Phosphorylierung von c-Jun wurde als Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1, der bekanntermaßen bei der epithelialen Proliferation aktiviert wird, ebenfalls untersucht (Shaulian & Karin, 2001).

Für die Induktion der Phosphorylierung von ERK1/2 mit Manganoxid-Partikeln zeigte sich eine Aktivierung nach 4 Stunden Belastung durch die NP (Abbildung 3.30). Für Mn1 ist das Immunsignal signifikant um das 1,7-fache erhöht im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Mn2 führt zu einer 1,5-fachen Erhöhung und ist nur geringfügig stärker, als die Aktivierung durch Mn4, die das 1,3-fache der Kontrolle beträgt. Für Mn3 ist kein Unterschied zur PBS-Kontrolle erkennbar.

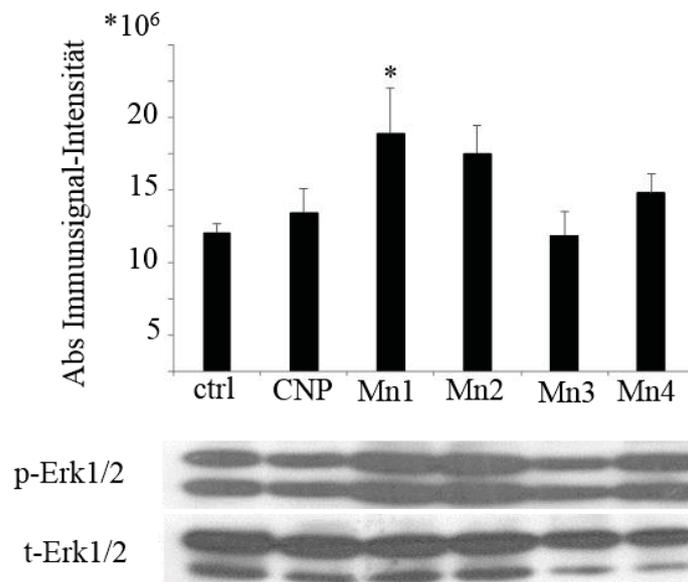


Abb. 3.30 Partikelinduzierte Aktivierung von ERK1/2 durch Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 4 Stunden mit 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Partikeln behandelt. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler der Immunsignalintensität von phospho-ERK1/2 aus 4 unabhängigen Western-Blot-Analysen. Der Nachweis des Gesamtproteins ERK1/2 (t-ERK1/2) diente als Ladekontrolle * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$)

Die Aktivierung von c-Jun zeigte sich nach 4 Stunden für die Konzentrationen 0,5 bzw. 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Abbildung 3.31). Werden die Zellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel belastet, ist eine Induktion der Phosphorylierung von c-Jun zu erkennen. Für Mn1 und Mn2 ist sie vergleichbar um das 4-fache erhöht, Mn4 führt zu einer leicht geringeren Aktivierung um das 3,5-fache der Kontrollwerte. Für alle 3 Partikel ist diese Induktion signifikant. Mn3 führt zwar ebenfalls zu einer 1,8-fachen Aktivierung, die jedoch nicht signifikant ist.

In der Belastung von $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist eine geringere Phosphorylierung von c-Jun zu erkennen. Mn1 und Mn2 verhalten sich wiederum ähnlich und induzieren die Phosphorylierung um das 3,4 bzw. 2,8-fache der Kontrolle. Mn3 und Mn4 führen zu einer nicht signifikanten, ca. 2-fach erhöhten Aktivierung. In isolierten Mann-Whitney-U-Tests ist der Unterschied zwischen den Konzentrationen für die Belastung mit Mn2 und Mn4 signifikant.

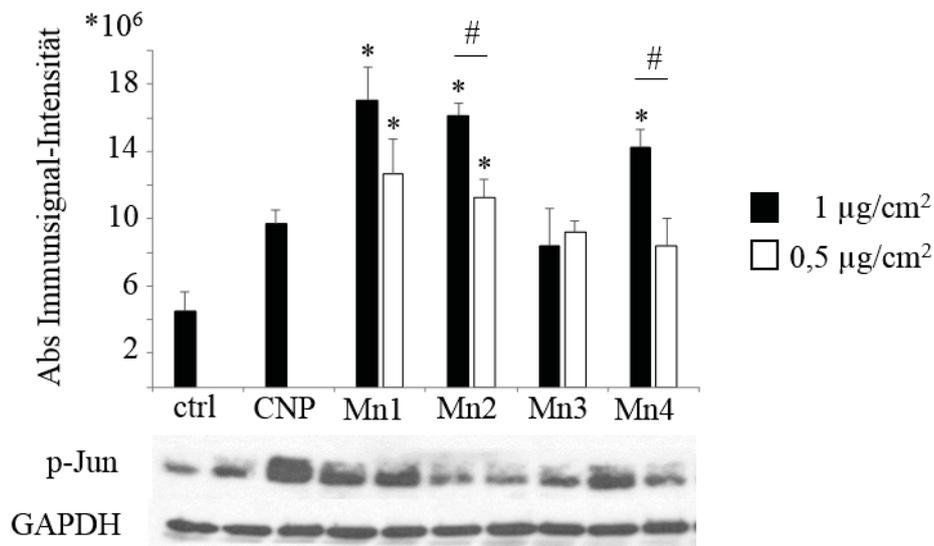


Abb. 3.31 Partikelinduzierte Aktivierung von c-Jun durch Manganoxid-Partikeln: RLE-6TN wurden für 4 Stunden mit 1 bzw. $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Partikeln behandelt. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler der Immunsignalintensität von phospho-c-Jun aus 3 unabhängigen Western-Blot-Analysen. Der Nachweis von GAPDH diene als Ladekontrolle * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$)

3.2.6. Partikel-induzierte ROS-Generierung und der Einfluss auf membranabhängige Signalwege

Mit Hilfe der in Kapitel 3.3 optimierten *Medium-throughput* Methode wurden für die Mangan-Partikel ebenfalls mechanistische Untersuchungen zur partikelinduzierten Aktivierung von ERK1/2 untersucht.

In Abbildung 3.32 sind die mikroskopischen Fluoreszenz-Bilder der ERK1/2-Aktivierung dargestellt. Für CNP, sowie die Mangan-NP Mn1, Mn2 und Mn4 ist in der Partikelbelastung nach 4 Stunden ohne Vorbehandlung eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Werden die Zellen für 18 Stunden mit N-Acetylcystein vorbehandelt, um die antioxidative Kapazität der Zellen zu erhöhen, ist nur noch eine geringfügig gesteigerte Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Probe zu erkennen.

Werden die Zellen mit Erlotinib, dem EGFR-Inhibitor vorbehandelt, ist ebenfalls ein Rückgang der ERK1/2-Aktivierung sichtbar.

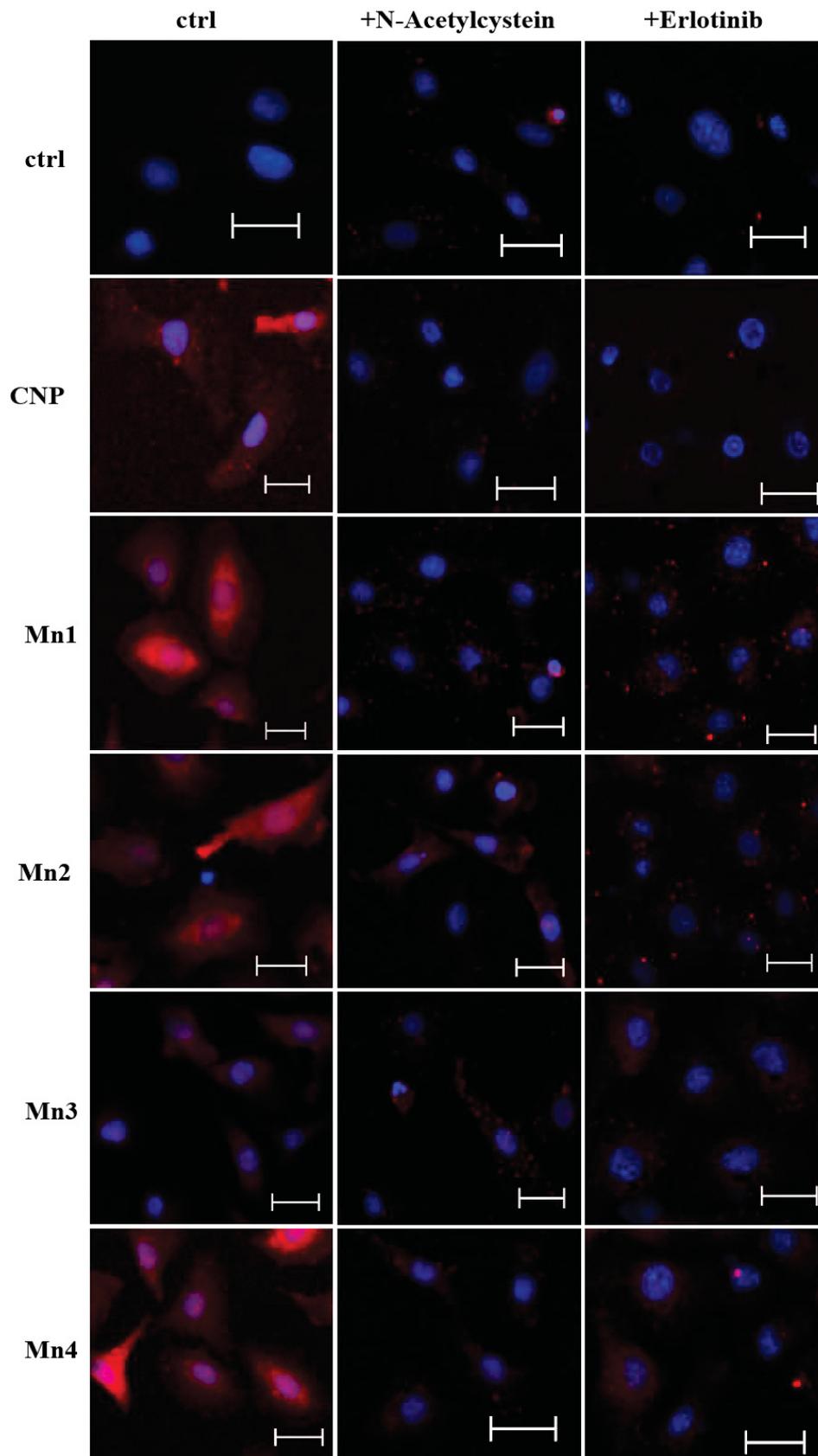


Abb. 3.32 Immunhistochemische Färbung von pERK1/2 in RLE-6TN-Zellen nach 4 Stunden Belastung: Die Zellen wurden für 18 Stunden mit 3 mM NAC oder 1 Stunde mit 10 μ M Erlotinib vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Partikelbelastung für 4 Stunden mit 5 μ g/cm². CNP (10 μ g/cm²) diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind ausgewählte Bereiche gefärbter Zellen. Phospho-ERK1/2 = rot; DAPI = blau; Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

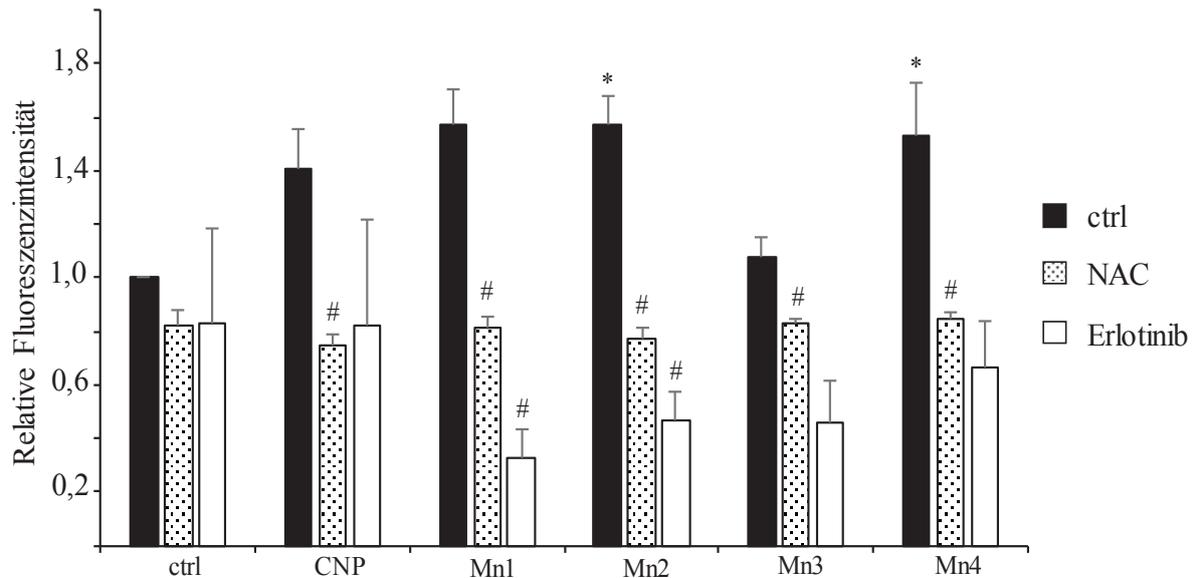


Abb. 3.33 Inhibierung der partikelinduzierten ERK1/2-Phosphorylierung nach 4 Stunden Belastung: RLE-6TN Zellen wurden für 4 Stunden mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel behandelt. Die Zellen wurden für 18 Stunden mit 3 mM N-Acetylcystein (gepunktet; $n=3$) oder 1 Stunde mit $10 \mu\text{M}$ Erlotinib (weiß; $n=3$) vorbehandelt. Schwarze Balken = ohne Vorbehandlung ($n=8$). Anschließend erfolgte die Belastung mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen. Die Auswertung zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler der relativen durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) nach 4 Stunden, gemessen im Cellomics HCS ArrayScan in Bezug auf die entsprechende PBS-Kontrolle. CNP ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) diente als Positivkontrolle. * signifikant unterschiedlich zur PBS-Kontrolle (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-T, $p < 0,05$); # signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung (Mann-Whitney-U, $p < 0,05$).

In Abbildung 3.33 ist die Quantifizierung der o.g. Mikroskopiebilder dargestellt. Ohne Vorbehandlung ist für CNP, Mn1, Mn2 und Mn4 eine Verstärkung des Signals auf das 1,6-fache der Kontrolle zu erkennen, die jedoch nur für Mn2 und Mn4 signifikant ist. Für die Vorbehandlung mit NAC ist für alle Belastungen ein Rückgang der Fluoreszenzintensität auf ca. 80% der unbehandelten PBS-Kontrolle zu erkennen. In isolierten Mann-Whitney-U-Tests ist der Unterschied zur nicht vorbehandelten Gruppe für alle Belastungen signifikant. Werden die Zellen für 1 Stunde mit Erlotinib vorbehandelt, ist für CNP zwar eine Reduzierung des Signals zu sehen, die jedoch auf Grund der starken Schwankung der Werte nicht signifikant ist. Für Mn1 und Mn2 wird die Aktivierung von ERK1/2 signifikant reduziert auf 0,4 bzw. 0,5 im Vergleich zur Kontrolle. Diese Abnahme der Intensität ist signifikant. Für Mn3 geht das Signal bis auf 60% der Kontrolle zurück, für Mn4 ca. 70%. Für beide Belastungen ist der Rückgang nicht signifikant.

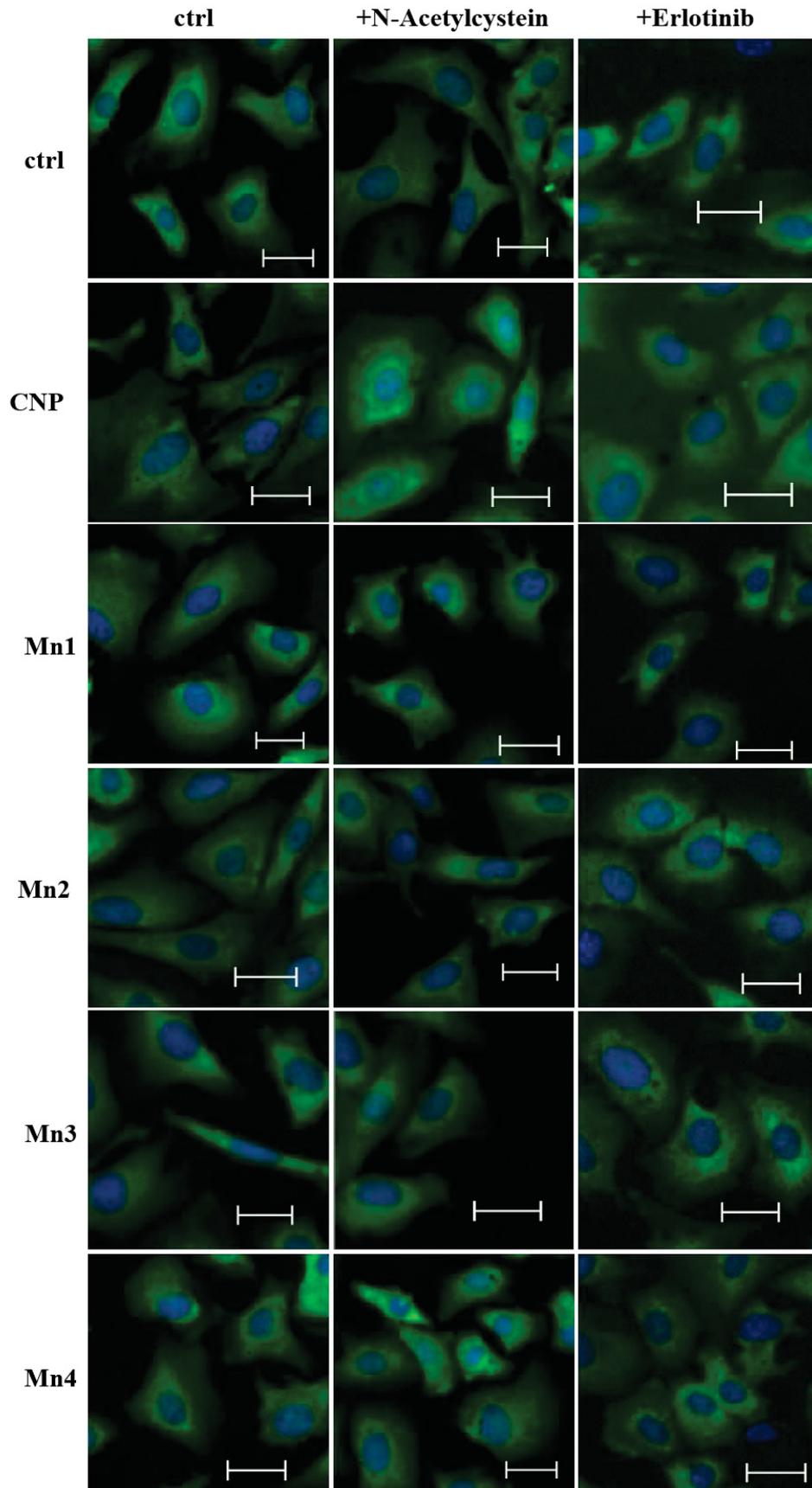


Abb. 3.34 Immunohistochemische Färbung von tERK1/2 in RLE-6TN-Zellen nach 4 Stunden Belastung: Die Zellen wurden für 18 Stunden mit 3 mM NAC oder 1 Stunde mit 10 μ M Erlotinib vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Partikelbelastung für 4 Stunden mit 5 μ g/cm². (CNP = 10 μ g/cm²). Dargestellt sind ausgewählte Bereiche gefärbter Zellen. total-ERK1/2 = grün; DAPI = blau; Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

In Abbildung 3.34 sind die Fluoreszenz-Bilder des totalen Proteingehalts der MAPK ERK1/2 dargestellt. Augenscheinlich ist zwischen den Belastungen sowie durch die Vorbehandlungen kein wesentlicher Unterschied in der Stärke der Fluoreszenz zu erkennen.

In Abbildung 3.38 ist die zugehörige Quantifizierung der Mikroskopie-Bilder dargestellt. Durch die Belastung mit Mn1 und Mn3 kommt es in der Kontrollgruppe zu einem leichten Anstieg des Proteingehalts, der aber unter 20% liegt. Für alle anderen Belastungen sowie Vorbehandlungen sind keine Unterschiede zur Kontrolle erkennbar.

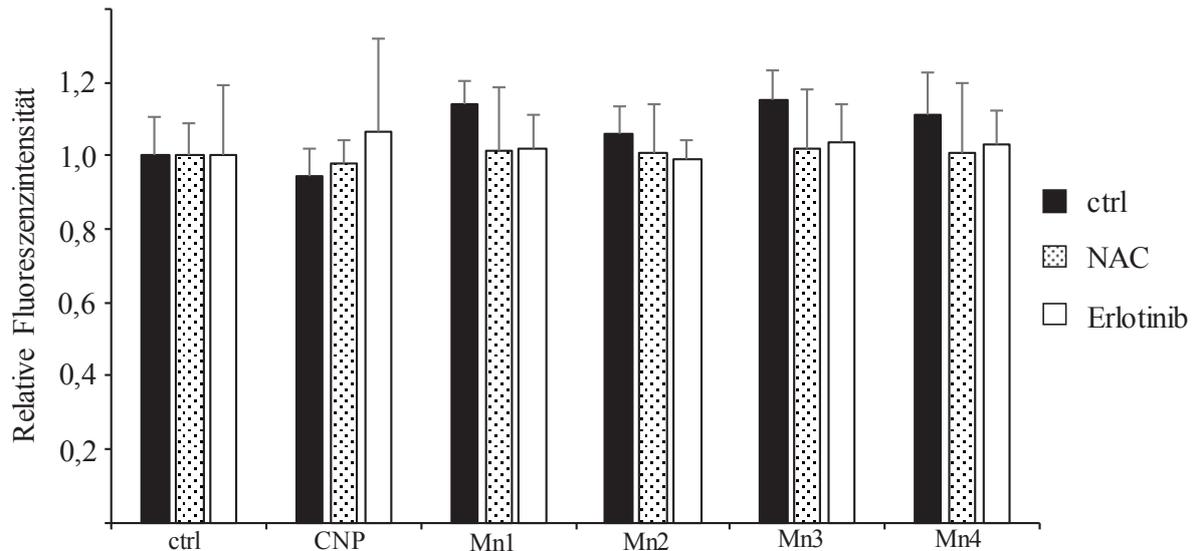


Abb. 3.35 Quantifizierung von tERK1/2 nach 4 Stunden Belastung: RLE-6TN Zellen wurden für 4 Stunden mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel behandelt. Die Zellen wurden für 18 Stunden mit 3 mM N-Acetylcystein (gepunktet;) oder 1 Stunde mit $10 \mu\text{M}$ Erlotinib (weiß;) vorbehandelt. Schwarze Balken = ohne Vorbehandlung. Anschließend erfolgte die Belastung mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikelsuspensionen. Die Auswertung zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist die relative durchschnittliche Fluoreszenzintensität von total-ERK1/2 (tERK1/2) nach 4 Stunden, gemessen im Cellomics HCS ArrayScan in Bezug auf die entsprechende PBS-Kontrolle.

3.2.7. Membranabhängige, partikelinduzierte Signaltransduktion

Da auch für die Mangan-Partikel die ERK1/2-Aktivierung mit Erlotinib inhibiert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass die Induktion dieses Signalweges, ähnlich wie für die oben gezeigten Modellpartikel, abhängig ist vom EGFR. In Abbildung 3.36 ist die Translokation des EGFR nach 5 Minuten, ausgelöst durch die Belastung mit Manganoxid-Partikeln dargestellt. Für die Belastung mit Mn1 ist eine deutliche Internalisierung des Rezeptors und vermehrte Ansammlung im Zytosol, vergleichbar mit CNP, erkennbar. Die stäbchenförmigen Nanopartikel Mn2 und Mn4 führen ebenfalls zu einer vermehrten Translokation, die allerdings stärker im gesamten Zytosol verteilt ist. Mn3, als Nicht-Nanopartikel führt kaum zu einem erkennbaren Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Da die Mangan-Partikel, wie schon weiter oben gezeigt, in der Lage sind, ROS zu generieren, wurden die Zellen mit dem Antioxidans Tocopherol vorbehandelt. Auf den Bildern ist zu erkennen, dass die Internalisierung, ausgelöst durch die Mangan-Partikel und CNP, inhibiert wird.

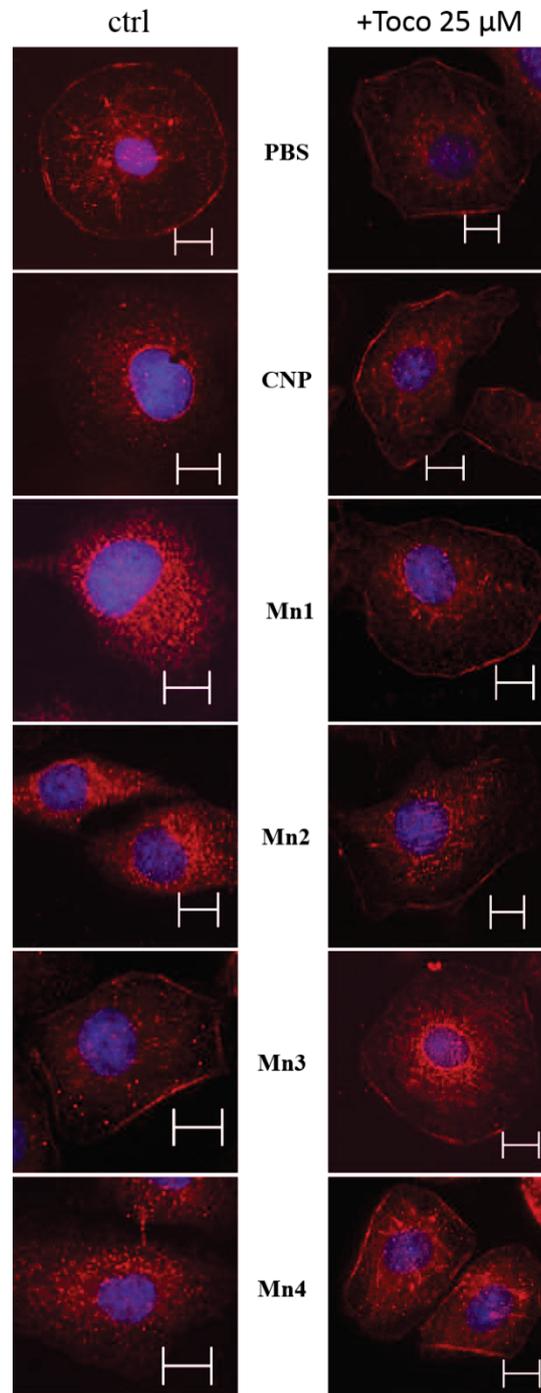


Abb. 3.36 Immunhistochemische Färbung des EGFR-Rezeptors in RLE-Zellen nach 5 Minuten: RLE-6TN Zellen wurden für 5 Minuten mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel behandelt. Die Zellen auf der rechten Seite wurden für 1 Stunde mit $25 \mu\text{M}$ Tocopherol vorbehandelt. Die Lokalisation des EGFR (rot) wurde analysiert mittels Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau); Maßstabsbalken entspricht $10 \mu\text{m}$.

4. Diskussion

Die Verwendung von Nanomaterialien in der Industrie und der Medizin hat in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung gewonnen. Aus diesem Grund ist eine toxikologische Betrachtung der Wirkung dieser Nanomaterialien auf biologische Systeme notwendig. Besonders eine mögliche Exposition am Arbeitsplatz, beispielsweise bei der Herstellung oder Weiterverarbeitung dieser Nanomaterialien, sollte berücksichtigt werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung verschiedener, metall-haltiger NP, als Modelle für moderne Nanomaterialien. Hierbei soll ein erster Eindruck gewonnen werden, inwieweit moderne Nanomaterialien, bestehend aus unterschiedlichen Metallen, einen Einfluss auf biologische Systeme, basierend auf einem *in vitro* Modell mit Lungenepithelzellen und einem *in vivo* Modell mit Mäuselungen, haben können.

Die verwendeten NP unterscheiden sich in Form, Größe, chemischer Zusammensetzung und Oberfläche. Untersucht wurde, ob bestimmte physikalische Eigenschaften der Partikel verantwortlich sind für ihre Wirkung auf molekulare Signalwege. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die MAPK-Signalwege, insbesondere ERK1/2, sowie die Relevanz membranabhängiger Prozesse, sowie reaktiver Sauerstoffspezies, gelegt.

Für die Untersuchungen wurden gezielt Partikel unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung ausgewählt, bestehend aus einem Nicht-Metall (Kohlenstoff), einem Halbmetall (Siliziumdioxid), sowie einem redox-inerten Transitionsmetall (Titandioxid). Zur Überprüfung der Relevanz der Partikelgröße wurden jeweils ein NP, sowie ein nicht-NP verwendet. Die molekularen Effekte, ausgelöst durch diese Partikel wurden in einem *in vitro* System untersucht und mit *in vivo* Ergebnissen verglichen, um die Relevanz des *in vitro* Systems zu bestätigen. Um eine schnelle Untersuchung großer Mengen an verschiedenen Nanomaterialien zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert, die es erlaubt, die Partikel-induzierte Aktivierung der MAPK ERK1/2 mikroskopisch zu untersuchen und darüber hinaus zu quantifizieren.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle reaktiver Sauerstoffspezies auf membranabhängige Signalprozesse, sowie der Relevanz der Redox-Aktivität der Partikel wurde zusätzlich ein Set von Manganoxid-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe, Gestalt und Oxidationsstufen synthetisiert und die Effekte auf molekulare Signalereignisse untersucht.

4.1. Relevanz des in vitro Systems

In einem ersten Schritt wurde zunächst untersucht, ob das bestehende in vitro-System der Arbeitsgruppe, basierend auf der Aktivierung von MAPK durch NP in Rattenlungen-Epithelzellen, die in vivo Situation widerspiegelt. Es gibt aus der Arbeitsgruppe bereits Vorarbeiten, die die Aktivierung von MAPK und daraus resultierende pathogene Endpunkte, wie Proliferation und Apoptose, ausgelöst durch CNP, zeigen (Sydlik *et al.* 2006; Unfried *et al.* 2007; Peuschel *et al.* 2010; Weissenberg *et al.* 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CNP in Ratten zu einer erhöhten Entzündung der Lunge führt. Dabei konnte in Western Blot Analysen des Lungenhomogenats eine vermehrte Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, sowie JNK1/2 gezeigt werden (Autengruber *et al.* 2014).

Aus weiteren Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass nicht nur CNP, sondern auch nano-SiO₂ und nano-TiO₂ die MAPK ERK1/2 im in vitro System mit Lungenepithelzellen dosisabhängig aktivieren können (vgl. Kapitel 1.7; Abb. 1.2). Zur Überprüfung der in vivo Relevanz dieser Befunde wurde ein Tierversuch mit diesen Partikeln durchgeführt. Dabei sollte gezeigt werden, ob dieser Effekt, ebenfalls wie im in vitro System, ein NP-spezifischer Effekt ist. Zur Größenkontrolle wurden zusätzlich nicht-NP, bestehend aus Kohlenstoff und TiO₂, verwendet.

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass nach 6 Stunden Partikelbelastung keine Erhöhung der Zellzahl in der BAL (Bronchoalveolare Lavage) beobachtet wird (s. Abb. 1.3). Das spricht dafür, dass die Partikel zum gewählten Zeitpunkt nicht zu einer Entzündungsreaktion in der Lunge führen. Das ist von Interesse für die weiteren Untersuchungen, da bereits gezeigt wurde, dass MAPK in Folge einer Entzündung aktiviert werden können (Kyriakis & Avruch, 1996). Um dies auszuschließen und einen direkten Partikel-Effekt zu untersuchen, wurde somit eine Partikelkonzentration gewählt, die zum gewählten Zeitpunkt zu keiner Entzündung führt. Bereits in Western-Blot-Analysen des Lungenhomogenats konnte eine vergleichbare Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch die NP, nicht aber die nicht-NP gezeigt werden (vgl. Kapitel 1.7; Abb. 1.2). Die Analysen des Lungenhomogenats stellen einen ersten Hinweis auf die NP-spezifische Aktivierung der MAPK in vivo dar. Aus diesem Grund wurden die histologischen, immunfluoreszierenden Gewebeschnitte angefertigt, um eine Lokalisation der aktivierten MAPK zu identifizieren. Dabei wurden gezielt alveolare Bereiche ausgewählt, um die Relevanz der Epithel-Zelllinie des in vitro Systems zu bestätigen.

In einem ersten Versuch wurde eine HE-Färbung der Gewebeschnitte durchgeführt, um zu sehen, ob es zu sichtbaren morphologischen Veränderungen des Gewebes durch die Partikel kommt (Abb. 3.1). Durch die Anfärbung von Zellkernen (Hämatoxylin) und extrazellulärer Matrix (Eosin) ist es möglich, Umstrukturierungen des Gewebes zu erkennen. Die Partikelbelastung zeigt hier keine Veränderung. Zur Identifizierung der unterschiedlichen Zelltypen in der Lunge, insbesondere alveolare Zelltypen, wurde eine TypII-Zellfärbung durchgeführt (Abb. 3.2). Auch hier zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Belastungen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die erhaltenen Ergebnisse auf molekularer Ebene nicht auf eine Zerstörung der alveolaren Strukturen zurück zu führen ist.

Sowohl für die MAPK ERK1/2, als auch für p38 und JNK1/2 ist eine verstärkte Aktivierung zu erkennen, wenn die Tiere mit den NP behandelt wurden (s. Abb. 3.3 – 3.5). Die Färbung ist deutlich in den alveolaren Bereichen erkennbar, so dass die Aktivierung der MAPK vermutlich in den Epithelzellen stattfindet. Durch die zuvor durchgeführte Zelltyp-spezifische SPC-Färbung war eine Zuordnung der spezifischen Signale zu den Epithelzellen in Alveolarbereichen möglich.

Für die MAPK ERK1/2 ist eine deutlich stärkere Aktivierung durch die NP zu sehen, aber auch die nicht-NP führen zu einem leichten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.3). Die Stärke der Aktivierung kann wie folgt abgestuft werden: CNP/nano-SiO₂/nano-TiO₂ > CP/TiO₂ > PBS. Es sind somit keine Unterschiede zwischen den NP erkennbar. Die Aktivierung von ERK1/2 kann ein Hinweis darauf sein, dass Signalwege aktiviert werden, die zu einer verstärkten Proliferation führen.

Auch für JNK1/2 ist ein Effekt durch die NP zu sehen (Abb. 3.4). Die Verstärkung der Phosphorylierung kann hierbei wie folgt eingeordnet werden: CNP > nano-SiO₂ > nano-TiO₂ > CP/TiO₂ > PBS. Im Vergleich zu ERK1/2 ist hierbei eine Unterscheidung zwischen den NP zu sehen, da CNP zu der stärksten Aktivierung führt, gefolgt von Silica und Titandioxid. Des Weiteren kann man hierbei deutlicher sehen, dass die Aktivierung nicht im gesamten alveolaren Bereich auftritt, sondern lokal in einzelnen Zellen. Anhand der SPC-Färbung lässt sich dennoch nicht unterscheiden, ob eine Färbung verstärkt in TypI- oder TypII-Zellen auftritt. Dies könnte an einer möglichen inhomogenen Deposition der Partikel im Gewebe liegen. Für die nicht-NP kommt es hierbei ebenfalls zu einer geringen Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle. Die Phosphorylierung von JNK1/2 kann ein Hinweis darauf sein, dass es durch die NP zu einer Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege kommt. Für eine Belastung mit CNP konnte bereits gezeigt werden, dass sie in Rattenlungen zu Apoptose in isolierten Neutrophilen aus der BAL führen können (Sydlik *et al.* 2013).

Für P38, ein Marker für pro-inflammatorische Signalwege, ist ebenso eine verstärkte Aktivierung zu sehen, wenn die Tiere mit NP belastet wurden (Abb. 3.5). Hierbei zeigten sich allerdings sehr inhomogene Ergebnisse zwischen den Tieren innerhalb einer Belastungsgruppe. Sowohl für nano-SiO₂, als auch für nano-TiO₂ ist eine deutliche Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Für CNP ist eine leichte Verstärkung der Aktivierung für 2 der 3 Tiere erkennbar, für ein Tier ist diese deutlicher sichtbar. Für TiO₂ ist nur eine leichte Phosphorylierung in einzelnen Zellen zu sehen. Für CP ist ebenfalls in 2 von 3 Tieren nur eine leichte bis gar keine verstärkte Fluoreszenz zu erkennen. In einem Tier ist die Aktivierung allerdings verstärkt sichtbar und deutlicher im Vergleich zur Behandlung mit CNP. Dies kann auf einen Partikeleffekt zurück zu führen sein. Da jedoch in den anderen Tieren der Behandlungsgruppe kein Effekt sichtbar war, kann es ebenfalls auf eine zuvor bereits vorhandene Erkrankung des Tieres oder zu großen Stress während der Belastung zurück zu führen sein. Da P38 ein Marker für pro-inflammatorische Signalwege ist, ist es denkbar, dass durch ein versehentlich von außen eingebrachtes bakterielles Pathogen eine Reaktion ausgelöst wurde, die zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Entzündungsreaktion führen kann.

Werden die Tiere mit den nicht-NP behandelt, ist meist nur eine leichte bis gar keine verstärkte Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Befunden aus den Western Blot Analysen und den Ergebnissen des *in vitro* Systems überein (vgl. Abb. 1.2). Die Zelllinie, bestehend aus Lungenepithelzellen, scheint somit, was die Aktivierung der MAPK durch NP angeht, ein guter Hinweis auf die tatsächliche *in vivo* Situation zu sein. Dennoch müssen *in vitro/in vivo* Vergleiche immer kritisch betrachtet werden, abhängig vom betrachteten Endpunkt, der verwendeten Partikel, der Art der Zelllinie und des Tierstamms. Die Korrelation von *in vitro* mit *in vivo* Untersuchungen wurde in der Vergangenheit bereits vermehrt diskutiert.

Bei dem Versuch, ein *in vitro* System zu etablieren, um verlässliche Vorhersagen zur tatsächlichen *in vivo* Situation zu treffen, müssen viele unterschiedliche Faktoren berücksichtigt werden. Häufig sind die Aussagen, bzw. Mechanismen, die man mit einem *in vitro*-System untersuchen kann, aufgrund der möglichen Versuchsparameter limitiert. So sind beispielsweise Langzeiteffekte in einem *in vitro* Modell nicht einfach nachstellbar, da *in vivo* Mechanismen, wie bspw. Clearance (Anderson *et al.* 2015), systemische Verteilung (Geiser & Kreyling, 2010), Zell-Zell-Interaktionen (Joris *et al.* 2013) nicht untersucht werden können, die aber für die toxischen Effekte der NP relevant sein können.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Induktion der Inflammation durch NP in der Lunge. Hierbei gibt es sehr widersprüchliche Schlussfolgerungen. Sayes und Co-Autoren (2007) kommen aufgrund ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass es nur eine leichte bis gar keine Korrelation zwischen der *in vivo* und der *in vitro* Situation gibt, wenn man sich auf die Endpunkte Zytotoxizität, sowie Entzündung fokussiert. Dies könnte am Studiendesign und den unterschiedlichen Parametern, wie Zeitpunkt, Dosis, Zelllinie, Tierart liegen.

In einer Studie von Duffin *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass es durchaus einen Zusammenhang zwischen der Reaktivität von Partikeln und ihrer spezifischen Oberfläche gibt, welche ebenfalls in einem *in vitro* System reproduziert werden konnte. Hierbei wurden verschiedene NP in Rattenlungen instilliert und die inflammatorische Reaktion untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg der Entzündungsreaktion mit zunehmender Partikeloberfläche. Des Weiteren wurde in humanen Bronchialepithelzellen ein Zusammenhang zwischen der IL-8 (Interleukin-8) Produktion und der Partikeloberfläche hergestellt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass durch die Untersuchung der IL-8 Ausschüttung in den Epithelzellen, unter Berücksichtigung der Partikeloberfläche, eine Vorhersage auf eine mögliche Entzündungsreaktion *in vivo* getroffen werden kann.

In einer Studie von Han *et al.* (2012) wurden ebenfalls *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse verglichen, im Hinblick auf Zytotoxizität, sowie Protein-Oxidation. Hierbei wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt, die zum Ziel hatten, die physikalischen Eigenschaften, sowie gemessenen Parameter zu korrelieren. Dabei stellte sich heraus, dass das Vergleichen der Massen der eingesetzten Partikel zu keiner eindeutigen Korrelation führt. Werden allerdings die Oberflächen verglichen, erhält man eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen im Tierversuch und im Zellkultur-System. Somit scheint die Partikelgröße nicht immer ein Indikator, dennoch ein erster Hinweis auf eine mögliche Toxizität zu sein. Viel aussagekräftiger scheint jedoch die Partikel-Oberfläche zu sein, die es in vielen Fällen möglich macht, aus *in vitro*-Ergebnissen Vorhersagen über eine mögliche Reaktion *in vivo* zu treffen.

Somit ist es, abhängig vom gewählten Versuchssystem, von den gewählten Partikeln und den betrachteten Endpunkten durchaus möglich, mit Hilfe eines *in vitro* Testsystems eine mögliche Reaktion *in vivo* vorherzusagen. Im gezeigten Versuchsansatz der Arbeit wurde, ausgehend von bereits vorhandenen *in vitro* Ergebnissen versucht, diese in einem Tiermodell zu reproduzieren. Hierbei wurden gezielt Epithelzellen in alveolaren Bereichen der Lungen untersucht, um die Ergebnisse mit dem *in vitro* System, basierend auf Lungenepithelzellen zu vergleichen.

Des Weiteren wurde ein früher Zeitpunkt für die Untersuchungen ausgewählt, um sekundäre Effekte aufgrund einer Entzündungsreaktion zu vermeiden. Darüber hinaus wurden frühe molekulare Signalereignisse betrachtet, die erste Hinweise auf eine mögliche Auslösung pathogener Endpunkte liefert. Für eine erste Einschätzung früher Effekte *in vivo*, ausgelöst durch die NP, in Bezug auf die Aktivierung MAPK-abhängiger Signalwege ist das *in vitro* Testsystem durchaus anwendbar und verlässlich.

Tab. 4.1 Übersicht der Partikel-induzierten ERK1/2-Aktivierung *in vitro* und *in vivo*

	Western Blot In vitro	Western Blot In vivo	Immunhistochemische Färbung <i>in vivo</i>
CNP	+	+	+
CP	-	-	-
Nano-SiO₂	+	+	+
Nano-TiO₂	+	+	+
TiO₂	-	-	-

Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Aus den Voruntersuchungen der Western Blot Analysen *in vitro* und *in vivo* konnte eine spezifische Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch die NP, nicht aber die nicht-NP gezeigt werden. In den in der Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen konnte diese Aktivierung ebenfalls ausgelöst durch die NP gezeigt werden. Darüber hinaus war es möglich zu zeigen, dass diese Reaktion der MAPK in den Epithelzellen vorliegt, um somit die Relevanz des *in vitro* Systems mit Lungenepithelzellen zu bestätigen.

4.2. Membranabhängige Signalwege, ausgelöst durch moderne Nanomaterialien

In Kapitel 1.7 wurde durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Aktivierung von MAPK, wie bereits für CNP gezeigt, auch durch weitere Nanomaterialien, bestehend aus Siliziumdioxid und Titandioxid, ausgelöst werden kann. In Kapitel 4.1 wurde die Relevanz der Aktivierung im Zellkultur-System durch eine *in vivo* Untersuchung bestätigt. Im Folgenden wurden mechanistische Untersuchungen zur Aktivierung membranabhängiger Signalwege für diese und weitere Partikel im bekannten *in vitro* System angestellt. Dazu wurde zusätzlich eine Mikroskopie-basierte *Medium-throughput* Methode verwendet.

In einem ersten Schritt wurden zunächst Untersuchungen zum Einfluss der Partikel auf die Zellviabilität durchgeführt, um relevante Konzentrationen für die nachfolgenden Versuche zu identifizieren. In Abbildung 3.6 ist der Einfluss der Modellpartikel auf die Proliferationsrate dargestellt. Durch SiO₂, sowie TiO₂ und nano-TiO₂ kommt es nach 24 Stunden zu einer reduzierten Proliferation, die allerdings nicht signifikant ist und sich nach 48 Stunden wieder auf Kontrollniveau befindet. Allein durch CNP ist nach 24 und 48 Stunden durch 1 µg/cm² Belastung eine erhöhte Proliferationsrate messbar. Eine erhöhte Proliferation durch Belastung mit CNP konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Sydlik *et al.* 2006). In einem weiteren Assay, der als Endpunkt die metabolische Aktivität der Zellen betrachtet, konnte kein signifikanter Einfluss durch Partikelbelastung in den untersuchten Konzentrationen festgestellt werden (Abb. 3.7). Das bedeutet, dass die Konzentrationen, die für die Versuche zur Signaltransduktion verwendet wurden, keine akute Toxizität auslösen.

Bereits in verschiedenen Studien wurde die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies als ein Auslöser für molekulare Signalereignisse ausgemacht (Albrecht *et al.* 2004; Donaldson *et al.* 2005). Weissenberg *et al.* zeigten 2010, dass die Aktivierung von ERK1/2, sowie AKT in RLE-Zellen, ausgelöst durch CNP, durch Antioxidantien inhibiert werden kann.

Somit ist die Partikel-induzierte MAPK-Aktivierung durch CNP unter anderem abhängig von Partikel-induzierten ROS. Basierend auf diesen Vorkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies der Partikel untersucht, sowie der Zusammenhang zwischen ROS bzw. oxidativem Stress und der Induktion membranabhängiger Signalwege. In einem ersten Versuch wurde dazu die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, ausgelöst durch die Modellpartikel, untersucht.

Mit der Mikroskopie-basierten Methode war die Färbung lebender Zellen mit dem Farbstoff DCF schwierig und lieferte keine befriedigenden Ergebnisse. Die Färbung mit DHE lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass die NP, nicht aber die nicht-NP in der Lage sind, intrazellulär reaktive Sauerstoffspezies zu generieren (Abbildung 3.13). Zusätzlich liefern die zugehörigen Fluoreszenz-Bilder einen Hinweis darauf, dass die Generierung von ROS ausgelöst durch die NP stärker ist, im Vergleich zu den nicht-NP und der Kontrolle (Abbildung 3.12). Da eine exakte Fokussierung der Fluoreszenzbilder nicht möglich war, zeigen sich die Unterschiede in der Quantifizierung weniger deutlich. Eine Messung intrazellulärer ROS mit DHE ist mit dem vorliegenden System somit möglich, allerdings nicht ideal geeignet. Aus Vorarbeiten ist jedoch bereits bekannt, dass diese Partikel nano-spezifisch reaktive Sauerstoffspezies generieren können.

Büchner *et al.* zeigten 2013, dass CNP in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu generieren. Hierbei wurde in 2 verschiedenen Zelltypen (Ratten-Lungenepithel-, humane Endothelzellen) eine Erhöhung der intrazellulären ROS nach Belastung mit CNP gezeigt. Dabei unterschied sich die Stärke je nach Zellart oder gewähltem Farbstoff (DCF oder DHE). Hierbei zeigte sich ein geringerer Unterschied zwischen Kontrolle und Partikelbelastung, wenn der Nachweis mit DHE erfolgte.

In einer Studie von Hussain *et al.* von 2010 wurde gezeigt, dass Titandioxid-NP in humanen Bronchial-Epithelzellen zeitabhängig zu einer Erhöhung intrazellulär generierter Sauerstoffspezies führen. Im direkten Vergleich mit CNP ist der Anstieg nach 30 Minuten stärker, sinkt danach leicht ab und bleibt bis nach 4 Stunden relativ konstant. Dahingegen steigt die intrazelluläre ROS-Generierung durch CNP bis auf 2 Stunden kontinuierlich an und bleibt anschließend in einer Plateau-Phase.

Auch für amorphe Siliziumdioxid-NP konnte gezeigt werden, dass diese dosisabhängig reaktive Sauerstoffspezies in humanen Nierenzellen generieren können (Passagne *et al.* 2012). In dieser Studie konnte ebenfalls der Nachweis erbracht werden, dass nicht-NP keine Erhöhung intrazellulärer Superoxid-Level bewirken. Im Gegensatz dazu zeigten Kyung *et al.* 2009, dass Silica-NP verschiedener Größen zu keiner signifikanten Erhöhung intrazellulärer ROS-Level führen, trotz dosis- sowie größenabhängiger Zytotoxizität.

Wie schon in Buechner *et al.* (2013) zu sehen, unterscheiden sich die Mengen an generierten Sauerstoffspezies in unterschiedlichen Zelltypen. In der Studie von Kyung *et al.* wurden Maus-Keratinocyten verwendet. Da diese, als Haut-Epithelzellen mehr äußeren Faktoren ausgesetzt sind, müssen sie von Natur aus eine höhere antioxidative Kapazität, sowie Stress-Toleranz aufweisen. Das würde eventuell begründen, warum diese unter den gewählten Bedingungen keine erkennbare Erhöhung der intrazellulären ROS aufweisen. In einer weiteren Studie mit humanen Bronchial-Epithelzellen konnte eine dosis-abhängige Induktion reaktiver Sauerstoffspezies für 2 unterschiedliche Silica-NP gezeigt werden (Akhtar *et al.* 2010). Somit ist davon auszugehen, dass Lungen-Epithelzellen sensitiver auf die Belastung mit Silica-NP reagieren. Es ist somit wahrscheinlich, dass RLE-Zellen ebenfalls ROS bilden, nach Belastung mit Silica-NP. Die Erhöhung der DHE-Fluoreszenz ist ein weiterer Hinweis darauf (Abbildung 3.12 und 3.13).

Bei allen Studien, sowie den Ergebnissen aus 3.1.3 muss außerdem beachtet werden, mit welcher Methode die reaktiven Sauerstoffspezies gemessen wurden. DHE wird spezifisch für den Nachweis intrazellulärer Superoxid-Anionen (O_2^-) verwendet, wohingegen DCF mit sämtlichen reaktiven Sauerstoff-, sowie reaktiven Stickstoffspezies reagiert und somit ein Indikator für den gesamten oxidativen Stress der Zelle darstellt. Man bekommt einen guten Überblick der intrazellulären Situation bezüglich ROS, allerdings ist unklar, welche Spezies hier bevorzugt generiert werden. Darüber hinaus wurde bereits diskutiert, dass DCFH₂, welches das nicht-fluoreszente Produkt nach Abspaltung der Acetat-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen darstellt, nicht nur in der Lage ist, durch Reaktion mit ROS zum fluoreszenten DCF umgesetzt zu werden, sondern ebenfalls selbst in der Lage ist, ROS zu generieren (Rota *et al.* 1999; Bonini *et al.* 2006). Es ist darüber hinaus möglich, dass das gebildete DCFH₂ mit intrazellulären Bestandteilen, wie beispielsweise zytoplasmatische Oxidasen, Peroxidasen oder Cytochrom C interagiert und so ebenfalls zum fluoreszenten Farbstoff umgesetzt wird (Karlsson *et al.* 2010). Somit muss die Aussage, bezüglich der tatsächlichen, absoluten Generierung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies kritisch betrachtet werden. Da allerdings in der Regel Kontrollen durchgeführt werden und die Menge reaktiver Sauerstoffspezies relativ zur unbehandelten (bzw. nur Lösemittel-behandelten) Probe angegeben wird, ist dieser Test dennoch ein guter Marker für erste Hinweise auf das Vorliegen von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies.

Die Generierung von oxidativem Stress durch NP, beispielsweise durch Aufnahme in die Zelle und Interaktion mit zellulären Kompartimenten ist nur eine mögliche Quelle für ROS. Eine weitere Möglichkeit, wie ROS gebildet werden können, ist durch die Redoxaktivität der Partikel selbst. Das bedeutet zum Beispiel, dass sie in der Lage sind, mit reaktiven Sauerstoffspezies zu interagieren und die Haber-Weiss oder Fenton-Reaktion zu katalysieren.

Titan ist zwar ein Übergangsmetall, da Titandioxid aber sehr schwer löslich ist, gilt es als redox-inert (Urner *et al.* 2014). Zur Untersuchung der Redoxaktivität, sowie den Einfluss dieser auf molekulare Signalereignisse, wurde zusätzlich ein Set von Nanopartikeln bestehend aus Manganoxid gewählt. Hierbei konnten gezielt Untersuchungen angestellt werden zur intrinsischen oxidativen Kapazität und der Generierung intrazellulärer ROS, sowie den Einfluss auf MAPK-Signalwege der Partikel abhängig von ihrer Größe, Form, sowie Oxidationsstufe im Vergleich zu den Modellpartikeln.

In ersten Versuchen wurde die Redoxaktivität der Mangan-Partikel in einem zellfreien System untersucht (Abb. 3.27). Für alle 4 Mangan-Partikel steigt die DCF-Fluoreszenz mit der Zeit an. Für Mn1 (Mn_3O_4) ist dieser Anstieg allerdings nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Für Mn2 und Mn4 (MnO_2), beide stäbchenförmig, steigt die ROS-Generierung kontinuierlich an und endet nach 30 Minuten in einem 4-fach höheren Wert im Vergleich zur Kontrolle. Auch für Mn3 (MnO_2), den nicht-NP ist eine signifikante Erhöhung zu sehen, die vergleichbar mit CNP ist und für beide Partikel nach 30 Minuten in einem ungefähr 2,5-fach höheren Anstieg endet. Da Mn2 und Mn4 in ihrer Dimension relativ ähnlich sind, ist ein vergleichbarer Anstieg zu erwarten. Mn3, als größerer nicht-NP führt im Vergleich zu einer geringeren ROS-Generierung. Diese Unterschiede sind somit wahrscheinlich durch die Oberflächenunterschiede der Partikel erklärbar. Mn1, als sphärischer NP mit der größten Oberfläche, führt entgegen der Erwartungen zu keiner signifikanten Generierung von ROS im zellfreien System. Die Redoxaktivität der Partikel scheint somit von der Oxidationsstufe der Partikel abzuhängen.

Mangan liegt im Mn_3O_4 in den Oxidationsstufen +II und +III vor. Möglich ist, dass diese Oxidationsstufen aufgrund ihrer hohen Stabilität nicht oder nur sehr gering in die Katalyse der Fenton-Reaktion eingreifen. Im Gegensatz dazu scheint Mangan in der Oxidationsstufe +IV in der Lage zu sein, H_2O_2 an der Oberfläche zu generieren. Ebenfalls sieht es so aus, als wäre dieser Effekt abhängig von der Partikeloberfläche, die für Mn2 und Mn4 ungefähr 4-fach größer ist, als für Mn3 (Vgl. Tab. 3.1). Es ist auch denkbar, dass die Reaktivität in diesem Fall von der Löslichkeit der Partikel abhängt. Beide Oxide (Mn_3O_4 und MnO_2) sind eigentlich nahezu unlöslich, dennoch ist es möglich, dass MnO_2 -Partikel in Kombination mit verschiedenen Faktoren des Zellkultur-Mediums einzelne Ionen in das Medium entlassen können, die für eine erhöhte Generierung von ROS verantwortlich sind.

Werden die Partikel im in vitro-System untersucht, ergibt sich ein völlig anderes Bild für die intrazelluläre Generierung von ROS. Hierbei wird nur durch die NP, nicht aber durch den nicht-NP, dosisabhängig oxidativer Stress produziert (Abbildung 3.28). Die Generierung intrazellulärer ROS scheint somit spezifisch für NP zu sein, ist aber nicht proportional zur Oberfläche, da Mn1 theoretisch eine mehr als 200-fach höhere Oberfläche besitzt als Mn3 und ca. 50-fach höher als Mn2 und Mn4 (Tab. 3.1). Peuschel *et al.* zeigten 2012 bereits, dass eine Partikelbelastung mit vergleichbaren Oberflächen von CNP und CP zwar zu einer erhöhten ROS-Induktion durch CP führt, diese aber nicht vergleichbar hoch ist, wie durch CNP ausgelöst. Somit ist die Oberfläche allein nicht der Auslöser für die Stärke der ROS-Generierung.

Die Oxidationsstufe der Partikel scheint keinen Einfluss auf die Induktion von oxidativem Stress zu haben, da für Mn1 und Mn2, trotz unterschiedlicher Oxidationsstufen, die Stärke der ROS-Generierung vergleichbar ist.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mangan-NP in einem Modellsystem für neuronale Zellen aufgenommen werden (Hussain *et al.* 2006). Für die in der Arbeit verwendeten Mangan-Partikel wurde die Granularität der Zellen nach Partikelbelastung, als Hinweis auf eine mögliche zelluläre Aufnahme, bestimmt. Da es nicht möglich war, die Partikel fluoreszent zu markieren und mikroskopisch nachzuverfolgen, wurde diese Methode als erster Hinweis auf eine mögliche Internalisierung verwendet. Obwohl bereits gezeigt wurde, dass die Toxizität von NP nicht abhängig ist von ihrer intrazellulären Aufnahme (Diaz *et al.* 2008), ist es dennoch ein interessanter Parameter in Bezug auf Partikelgröße und -form sowie möglicher Aufnahmemechanismen.

Die Granularität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zum Vergleich einer direkten oder endozytotischen Partikelaufnahme wurden die Zellen bei 37°C oder bei 4°C mit Partikeln belastet. Bei 4°C wird der Energiehaushalt der Zelle soweit heruntergefahren, dass keine Endozytose mehr stattfinden kann. Somit können die Partikel nur über direkten Membrantransport in die Zelle gelangen (Punnonen *et al.* 1998). In Abbildung 3.24 ist zu sehen, dass alle Partikel unter Normalbedingungen die Granularität der Zelle erhöhen. Für Mn2 liegt dieser Wert ein wenig niedriger, ansonsten sind kaum Unterschiede zwischen den Partikeln zu erkennen.

Der Effekt scheint somit weder von der Partikelgröße, noch von ihrer Redoxaktivität abhängig zu sein. Bei 4°C ist eine Reduktion erkennbar, die für Mn1 nicht signifikant ist. Aufgrund seiner geringen Größe ist es möglich, dass der Partikel die Membran passieren kann und so ins Innere der Zelle eindringt. Für die anderen 3 Partikel ist eine signifikante Reduktion sichtbar, die jedoch nicht bis auf Kontrollniveau zurückgeht. Dies spricht dafür, dass hier eventuell mehrere Mechanismen beteiligt sind, die eine Partikelaufnahme ermöglichen.

Zur genaueren mechanistischen Untersuchung wurden verschiedene Inhibitoren verwendet. In einem ersten Versuch wurden die Zellen mit Filipin inkubiert, um eine Caveolin-abhängige Partikelaufnahme zu inhibieren (Abbildung 3.25). Hierbei zeigt sich keine Reduktion der Granularität, was dafür spricht, dass dieser Aufnahmeweg für die Mangan-Partikel möglicherweise nicht relevant ist.

Die Zellen wurden zusätzlich mit Cytochalasin D inkubiert, um eine Aktin-abhängige Aufnahme der Partikel zu inhibieren. Hierbei zeigte sich eine Dosis-abhängige Abnahme der Granularität der Zellen (Abb. 3.26), die in der höheren Konzentration für Mn2, Mn3 und Mn4 signifikant ist, die jedoch wiederum nicht bis auf Kontrollniveau sinkt. Für Mn1 ist nur eine leichte Tendenz der Reduktion zu erkennen.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Partikel über verschiedene Mechanismen aufgenommen werden können. Für Mn1 scheint es, als wäre er aufgrund seiner geringen Größe in der Lage, die Zellmembran zu penetrieren. Für Mn2, Mn3 und Mn4 scheint die Aufnahme zum Teil über Aktin-abhängige Prozesse zu verlaufen. Eine Caveolin-abhängige Aufnahme scheint nicht wahrscheinlich. Dennoch könnten auch weitere Prozesse beteiligt sein, beispielsweise eine Clathrin-abhängige Aufnahme, oder eine Caveolin- und Clathrin-unabhängige Endozytose. Hierfür wären weitere Untersuchungen notwendig. Des Weiteren liefert die Messmethode nur einen ersten Hinweis, da nicht eindeutig bestimmt werden kann, ob die Partikel sich in der Zelle befinden, oder möglicherweise an der Außenseite der Membran haften. Hierfür wären mikroskopische Untersuchungen mit fluoreszenz-markierten Partikeln, oder massenspektrometrische Analysen hilfreich.

In diversen Studien wurde bereits die Notwendigkeit einer einfachen Screening-Methode gefordert und diskutiert, die es ermöglicht, nanoskalige Materialien bezüglich ihrer Toxizität zu untersuchen (Damoiseaux *et al.* 2011). Die EGF-abhängige Aktivierung der MAPK ERK1/2, gemessen mit Hilfe einer Mikroskopie-basierten Hochdurchsatz-Methode, konnte bereits gezeigt werden (Ghosh *et al.* 2004). Hierbei konnte eine Internalisierung von EGF und ERK1/2-Akkumulierung in der Zelle gezeigt werden.

Auf Basis dieser Vorkenntnisse wurde die Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch die verschiedenen NP, sowie mögliche Auslöser dieser Signalwege mit Hilfe eines HCS Readers untersucht, um mechanistische Wirkweisen der NP aufzuklären.

Wie bereits gezeigt, sind die Modellpartikel in der Lage, die MAPK ERK1/2 dosis-abhängig zu aktivieren (Abb. 1.2). Auch für die Mangan-NP konnte in Western Blot-Analysen gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, ERK1/2 zu aktivieren (Abb. 3.30). Hierbei zeigt sich die stärkste Aktivierung durch den NP Mn1, aber auch die stäbchen-förmigen Partikel Mn2 und Mn4 sind in der Lage, diesen Signalweg zu aktivieren. Dies ist ein erster Hinweis auf das Auslösen proliferativer Signalwege.

Die Aktivierung proliferativer Signalwege ist abhängig von vielen verschiedenen Kinasen, Proteinen und Transkriptionsfaktoren. Ein Bestandteil des Signalweges ist die Aktivierung von SAPK (*stress activated protein kinases*), die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen (Behrens *et al.* 1999).

Die Aktivierung von SAPK, wie z.B. JNK kann zu weiteren Signalwegen und pathogenen Endpunkten führen, beispielsweise Apoptose. JNK ist Teil einer Signalkaskade und ist unter anderem für die Phosphorylierung von c-Jun verantwortlich. Werden zusätzlich zu c-Jun noch weitere Proteine der AP-1 Familie, beispielsweise c-Fos oder fra-1 aktiviert, dimerisieren sie und bilden den Transkriptionsfaktor AP-1 (Mossmann *et al.* 2006), welcher zur Transkription von Genen zur Regulation des Zellzyklus, Apoptose oder Proliferation beiträgt (Shaulian & Karin 2001). Eine c-Jun abhängige Aktivierung von AP-1 wird in Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferation gebracht (Shaulian & Karin 2002).

Aus diesem Grund wurde die Aktivierung von c-Jun durch die Mangan-Partikel ebenfalls mit Western Blot Analysen untersucht. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Aktivierung durch die NP ebenfalls nach 4 Stunden Belastung (Abb. 3.31). Da beide Ereignisse, die Aktivierung von ERK1/2, sowie die Phosphorylierung von c-Jun, zum gleichen Zeitpunkt erfolgen, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Mangan-Partikel möglicherweise zu einer Induktion der Proliferation führen. Zur genaueren Überprüfung der Hypothese müssten hierzu weitere mechanistische Untersuchungen durchgeführt werden, beispielsweise eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.

In einem weiteren Schritt wurde versucht, die Partikel-induzierte Aktivierung der MAPK mittels einer Mikroskopie-basierten *Medium throughput* Methode zu reproduzieren. Hierbei wurden zunächst Zeitreihen für die Modellpartikel durchgeführt. Nach 1 Stunde zeigt sich für die NP eine Tendenz, dass diese in der Lage sind, ERK1/2 zu aktivieren (Abb.3.8). Nach 8 Stunden ist dieser Anstieg für CNP und nano-TiO₂ signifikant (Abb. 3.9). Die nicht-NP führen zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Aktivierung. Auf den mikroskopischen Aufnahmen ist der Unterschied zwischen den NP und nicht-NP deutlicher zu erkennen (Abb.3.8). Für die Belastung mit NP ist eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz zu sehen, die durch die nicht-NP nicht, oder nur in geringem Maße auftritt.

Zur Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen der Partikel verwendet und die Aktivierung nach 8 Stunden untersucht (Abb. 3.11). Hierbei ist zu sehen, dass für die Belastung mit 10 µg/cm² eine deutliche Aktivierung der MAPK durch die NP stattfindet, die durch die geringere Konzentration nicht mehr auftritt. Für die nicht-NP ist für keine der Belastungen ein Unterschied zur Kontrolle messbar.

Somit scheint die Aktivierung von ERK1/2 spezifisch für eine Belastung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der NP zu sein und am deutlichsten nach 8 Stunden aufzutreten. Für CNP wurde diese Aktivierung bereits in früheren Studien zum genannten Zeitpunkt gezeigt (Sydlik *et al.* 2006). Auch auf den mikroskopischen Bildern ist eine stärkere Fluoreszenz nach Belastung mit NP zu sehen, die reduziert wird, wenn die Konzentration verringert wird (Abb.3.10). Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Vorarbeiten überein, aus denen ebenfalls hervorgeht, dass die Aktivierung von ERK1/2 nach 8 Stunden dosisabhängig durch die NP erfolgt (Abb.1.2).

Wie bereits zuvor erwähnt, kann die Aktivierung der MAPK ERK1/2 über den EGF-Rezeptor erfolgen (Sydlik *et al.* 2006). Für CNP wurde bereits gezeigt, dass in Epithelzellen nach Partikelbelastung eine Internalisierung des EGFR erfolgte (Peuschel *et al.* 2010). Basierend auf diesen Arbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch weitere NP in der Lage sind, zu einer Aktivierung und somit Translokation des EGFR zu führen. Da es durch CNP zu einer biphasischen Aktivierung zu einem sehr frühen, sowie einem späten Zeitpunkt kommt (Sydlik *et al.* 2006), wurden in der folgenden Arbeit ebenfalls frühe, sowie späte Zeitpunkte untersucht. Dabei zeigte sich nach 5 Minuten und 8 Stunden eine Translokation des EGFR, ausgelöst durch die NP (Abb. 3.18 & 3.19). Durch die nicht-NP zeigt sich keine oder nur eine geringe Translokation. Der größte Anteil des Rezeptors verbleibt hierbei in der Zellmembran. Für die NP scheint die Translokation nach 5 Minuten deutlicher in der Nähe des Zellkerns lokalisiert zu sein, während sie nach 8 Stunden etwas diffuser im gesamten Cytosol erscheint. Eine Möglichkeit ist, dass bereits ein Rücktransport des EGFR zur Plasmamembran begonnen hat (Tomas *et al.* 2014). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine frühe Aktivierung des EGFR durch ultrafeines *Carbon black* zu einer Hochregulierung von Liganden des Rezeptors, wie HB-EGF (*proheparin-binding EGF*) oder Amphiregulin, führen kann (Blanchet *et al.* 2003). Diese Hochregulierung könnte somit zu einem „autokrinen Loop“ führen und die vermehrte Ausschüttung an Liganden zu einem späteren Zeitpunkt den Rezeptor erneut aktivieren.

Auch für die Mangan-Partikel wurde untersucht, ob sie in der Lage sind, zu einer Translokation des EGFR zu einem frühen Zeitpunkt zu führen. Aufgrund der starken ROS-Generierung durch die Partikel wurden die Zellen darüber hinaus mit einem Antioxidans vorinkubiert, um eine mögliche ROS-abhängige Aktivierung des Rezeptors zu inhibieren.

In den mikroskopischen, immunfluoreszierenden Abbildungen ist zu erkennen, dass die NP (Mn1) zu einer verstärkten Translokation des Rezeptors führen (Abb. 3.36). Auch die stäbchenförmigen Partikel sind in der Lage zu einer Aktivierung zu führen. Für den nicht-NP Mn3 ist keine verstärkte Translokation im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Somit sind auch Transitionsmetalle in der Lage, zu einer Aktivierung des EGFR, als auch zu einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 zu führen. Für Eisen, als weiteres Transitionsmetall konnte eine Aktivierung ebenfalls bereits gezeigt werden (Weissenberg *et al.* 2010).

Wie bereits oben erwähnt, spielen Partikel-induzierte ROS bei der Aktivierung von MAPK-Signalwegen eine wichtige Rolle (Albrecht *et al.* 2004; Donaldson *et al.* 2005). Auch die EGFR-Aktivierung kann zu einer Induktion der MAPK ERK1/2 führen (Sydlik *et al.* 2006).

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Ergebnisse in Abhängigkeit zueinander stehen, wurden mechanistische Untersuchungen mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt.

Die Aktivierung der MAPK ERK1/2 ist Teil einer Signalkaskade mit mehreren Komponenten (Vgl. Kap. 1.6). Die Aktivierung erfolgt durch eine Phosphorylierung der Tyrosin- sowie Threonin-Stelle durch eine zuvor phosphorylierte MAPKK (*Mitogen activated protein kinase kinase*), auch MEK genannt (Cobb & Goldsmith, 1995). Zunächst wurde die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, ausgelöst durch die Modell-NP mit dem MEK-Inhibitor PD98059 unterdrückt, um die Relevanz bzw. Spezifität der Messmethode zu untersuchen (Abb. 3.14 & 3.15). Hierbei zeigt sich für alle Partikel eine signifikante Reduzierung der ERK1/2-Phosphorylierung auf Kontrollniveau. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die gemessene Fluoreszenz-Intensität tatsächlich die Menge an phosphorylierter MAPK widerspiegelt und nicht auf unspezifische Bindungen oder Interaktion mit Messparametern zurück zu führen ist.

Wie bereits weiter oben erläutert und in den Abbildungen 3.12 und 3.13 gezeigt, gibt es erste Hinweise darauf, dass die Modell-NP in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies in den Epithelzellen zu generieren. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit einem Antioxidans vorbehandelt, um mögliche ROS abzufangen und so eine eventuelle Aktivierung der MAPK zu inhibieren. Für die Modellpartikel zeigt sich eine Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung auf Kontrollniveau, was für eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies spricht (Abb. 3.14 & 3.15).

Für CNP wurde diese Beteiligung von ROS an der Aktivierung der MAPK-spezifischen Signalkaskade bereits gezeigt (Weissenberg *et al.* 2010). In einer Studie von Liu & Sun (2010) wurde gezeigt, dass Silica-NP in humanen Endothelzellen dosisabhängig zu einer verstärkten Aktivierung von ERK1/2 führen und ebenfalls intrazelluläre ROS generieren können.

Auch für die Mangan-Partikel kann die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 durch Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Zelle auf Kontrollniveau reduziert werden (Abb. 3.33). Auch in den zugehörigen mikroskopischen Fluoreszenz-Bildern ist nur noch eine schwache bis gar keine Färbung mehr zu sehen (Abb. 3.32). Somit scheint die Phosphorylierung von ERK1/2, ausgelöst durch die Mangan-Partikel ebenfalls abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies zu sein. Für Eisen, ebenfalls ein Transitionsmetall, wurde bereits gezeigt, dass es in der Lage ist, MAPK-Signalwege über reaktive Sauerstoffspezies zu aktivieren (Weissenberg *et al.* 2010). Es scheint, als sei dieser Signalweg spezifisch für NP, die eine erhöhte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies aufweisen.

Aufgrund der vorausgegangenen Ergebnisse, die eine Translokation des EGFR, ausgelöst durch die NP gezeigt haben, wurde nun untersucht, ob die Aktivierung von ERK1/2 abhängig ist von einer vorausgehenden Aktivierung des Rezeptors. Für die CNP-induzierte Aktivierung von ERK1/2 konnte ein Zusammenhang bereits gezeigt werden (Sydlik *et al.* 2006; Unfried *et al.* 2007). Im folgenden Versuchsansatz wurden die Zellen mit dem spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib vorbehandelt, um eine Aktivierung des Rezeptors zu verhindern.

Für die Modellpartikel zeigte sich wiederum eine Reduzierung der ERK1/2-Phosphorylierung auf Kontrollniveau (Abb. 3.14). Auch die Phosphorylierung, ausgelöst durch Mangan-Partikel, konnte inhibiert werden (Abb. 3.33). Somit scheinen sowohl die Modellpartikel, als auch die Mangan-Partikel mechanistisch ähnliche Signaltransduktionen auszulösen, die in einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 resultiert.

Die verschiedenen Mechanismen, die durch eine Belastung von NP ausgelöst werden können, sind vielseitig und bis heute nicht alle ausreichend untersucht. Die Aktivierung von MAPK wurde bereits in mehreren Studien diskutiert und stellt eine der wichtigsten Signalwege dar, die durch NP-generierten Stress ausgelöst werden und zu pathogenen Endpunkten führen können (Kyriakis & Avruch, 2012). Aus diesem Grund werden diese Signalwege in Bezug auf NP-Toxizität häufig untersucht und diskutiert. Als Auslöser für inflammatorische bzw. Stress-abhängige Antworten wurden drei wichtige Kinasen definiert: ERK1/2, als Auslöser für proliferative Signalwege, JNK1/2, als initiales Ereignis bei der Aktivierung pro-apoptotischer Prozesse, sowie p38, als früher Indikator für pro-inflammatorisches Signalling (Kim *et al.* 2005; Unfried *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die MAPK ERK1/2 gezielt ausgesucht, da sie eine zentrale Rolle in der Aktivierung stress-vermittelter Signalkaskaden spielt (Plotnikov *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK ERK1/2 spezifisch für nanoskalige Materialien ist. Dabei spielen reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle. Die chemische Zusammensetzung der Partikel scheint allerdings für die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies nicht von besonderer Bedeutung zu sein. Es wurden nicht-metallische, halbmimetische, Redox-inerte, sowie Redox-aktive Partikel verwendet. Für die Kohlenstoff-Partikel konnte bereits in früheren Studien eine erhöhte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies gezeigt werden (Weissenberg *et al.* 2010). Für TiO₂ und SiO₂ war es mit den in der Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich, eine eindeutige Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zu zeigen. Lediglich die Messung mit DHE liefert einen Hinweis auf ein vorliegen intrazellulärer ROS. Dennoch konnte eine Abhängigkeit der ERK1/2-Aktivierung mit Hilfe von Antioxidantien gezeigt werden, so dass eine ROS-abhängige Aktivierung dieses Signalweges wahrscheinlich ist.

Die Oberfläche der Partikel scheint nicht proportional zur Aktivierungsstärke der MAPK bzw. der intrazellulären ROS zu sein. Für die Mangan-Partikel wurden dazu theoretische Oberflächen berechnet, da eine BET-Messung nicht möglich war. Geht man von diesen Werten aus, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Oberfläche und der Menge intrazellulär generierter ROS. Darüber hinaus zeigen unterschiedliche Partikelformen, ob sphärisch oder stäbchen-förmig, ebenfalls ähnliche Resultate, so dass dieser Signalweg möglicherweise für alle nanoskaligen Partikel relevant sein könnte.

4.3 Einfluss der Redox-Aktivität auf mitochondrielle Prozesse

Auch für die Mangan-Partikel wurden zu Beginn Untersuchungen zur Zellviabilität durchgeführt. Hierbei zeigte sich weder ein Einfluss auf die Membranintegrität (Abb. 3.21), noch auf die Lysosomen-Integrität (Abb. 3.22) nach Belastung mit Mangan-Partikeln. Betrachtet man allerdings die metabolische Aktivität der Zellen nach Partikelbelastung mit Hilfe eines WST-1 Assays, ist eine deutliche Abnahme mit steigender Konzentration erkennbar (Abbildung 3.23). In vergangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte ROS-Generierung durch NP einen schädigenden Einfluss auf Mitochondrien haben können (Li *et al.* 2003).

Eine reduzierte metabolische Aktivität der Zellen könnte auf eine Schädigung der Mitochondrien aufgrund von ROS hindeuten. Aufgrund dieser Kenntnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Mangan-Partikel selbst, oder Partikel-induzierte reaktive Sauerstoffspezies möglicherweise einen Einfluss auf die Mitochondrien haben können.

Zur Untersuchung wurde die mitochondrielle Generierung von Superoxid-Anionen mit dem Farbstoff MitoSox-Red untersucht. Hierbei zeigte sich eine verminderte Generierung von Superoxid nach Belastung mit Mangan-Partikeln (Abb. 3.29). Die Reduktion der mitochondriellen Superoxid-Anionen, sowie der metabolischen Aktivität verhalten sich ähnlich. Für die Belastung mit Mn1 ist ein nicht signifikanter Rückgang mitochondrialer Superoxid-Anionen zu erkennen. Dieser Partikel führt auch zur schwächsten Reduzierung der metabolischen Aktivität, da in beiden Fällen eine Verringerung auf ca. 50% der Kontrolle zu sehen ist (Abb. 3.23; 3.29). Im Gegensatz dazu führen die drei MnO₂-Partikel zu einem signifikanten Rückgang der gemessenen MitoSox-Red Fluoreszenz und darüber hinaus auch zu einer starken Verringerung der metabolischen Aktivität. Für Mn2 und Mn4 sinkt die Superoxid-Generierung auf ca. 30% (WST-1: Mn2: 9%; Mn4 5%), für Mn3 auf 20% (WST-1 27%). Somit scheinen die Mangan-Partikel einen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen zu haben, die möglicherweise im Zusammenhang steht mit der Reduktion mitochondrialer Superoxid-Anionen.

Eine erste Hypothese war, dass die Mangan-Partikel einen Einfluss auf die Aktivität der mitochondrialen SOD haben. In der Zelle liegen verschiedene SOD vor, die, um aktiviert zu werden, ein Metallion im aktiven Zentrum benötigen. Die wichtigsten sind die SOD1, mit Kupfer/Zink im aktiven Zentrum und die SOD2, welche Mangan im aktiven Zentrum benötigt. In einer kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass humane Knochenzellen eine gesteigerte Generierung von Superoxid-Anionen und eine reduzierte Aktivität von SOD nach Belastung mit TiO₂-Partikeln zeigten (Niska *et al.* 2015). Dies bedeutet, dass durch die Partikelbelastung die Funktion der SOD eingeschränkt wird und es so vermutlich zu einer erhöhten Generierung von Superoxid kommt.

Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass es durch die Mangan-NP zu einer erhöhten Aktivität der SOD kommen könnte. Dazu wäre es möglich, dass die Partikel, oder ihre Ionen bis in die Mitochondrien vordringen und dort die vorliegende inaktive SOD2 durch einen Überschuss an Mangan-Ionen aktivieren können, in dem sich die Mangan-Ionen in das aktive Zentrum der SOD setzen und sie somit aktivieren. Die erhöhte Generierung an intrazellulärem Wasserstoffperoxid, gemessen mit dem DCF-Assay (Abb.) könnte damit ebenfalls teilweise im Zusammenhang stehen, da durch die Umsetzung von Superoxid durch die SOD Wasserstoffperoxid entsteht (Unfried *et al.* 2007).

Um dazu eine Aussage treffen zu können, müssen allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden. In erster Linie sollte die Lokalisation der Mangan-Partikel in der Zelle und in den Mitochondrien gezeigt werden. Darüber hinaus sollten Aktivitätsmessungen der mitochondrialen SOD durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob diese durch die Partikel beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls eine mögliche Dissoziation der Partikel in der Zelle untersucht werden. Die vorliegenden Ergebnisse weisen allerdings auf eine mögliche Interaktion der Mn-Partikel mit den Mitochondrien hin.

5. Zusammenfassung

Industriell hergestellte Nanomaterialien stellen einen wichtigen Wirtschaftszweig für die Anwendung von NP in der Industrie dar. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften, insbesondere der Möglichkeit, sie zu modifizieren und für gezielte Anwendungen herzustellen hat ihre Bedeutung in den letzten Jahren vermehrt zugenommen. Da von ihnen aber auch mögliche toxische Risiken ausgehen können, ist es notwendig, sie in Hinblick auf eine Exposition des Menschen zu untersuchen und zellbasierte Untersuchungsmethoden zu etablieren, um ihre möglicherweise adversen Eigenschaften zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz der Aktivierung von MAPK in Epithelzellen im *in vitro* System mit Hilfe eines *in vivo* Versuchs durch Immunhistochemie verifiziert. Darüber hinaus wurden mechanistische Untersuchungen mit Hilfe einer „*Medium Throughput*“-Methode durchgeführt, die zu einer Aktivierung von MAPK-Signalwegen führen. Mit Hilfe eines Partikelsets, bestehend aus einem Redox-aktiven Transitionsmetall wurden vertiefte Studien zur Entstehung und Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies durchgeführt.

Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass *in vivo*, vergleichbar zur *in vitro* Situation, die MAPK in den Epithelzellen in Alveolarbereichen exponierter Mäuse aktiviert werden. Dabei wird die Aktivierung der MAPK nur durch NP, nicht aber für größere Partikel ausgelöst. Die chemische Zusammensetzung schien hierbei keinen Einfluss zu haben. Auch in den durchgeführten *in vitro* Studien konnte eine spezifische Aktivierung der MAPK ERK1/2 durch NP gezeigt werden. Die mechanistischen Untersuchungen ergaben, dass durch Partikel-induzierte reaktive Sauerstoffspezies, sowie eine Aktivierung und Translokation des EGFR eine Signalkaskade über ERK1/2 aktiviert wird. In vertieften Studien zur Generierung von intrazellulären ROS zeigte sich, dass diese nicht abhängig ist von der Redox-Aktivität der Partikel, sondern wahrscheinlich von der Größe, sowie Oberfläche der Partikel. In weiteren Untersuchungen zeigen sich erste Hinweise auf eine Interaktion von Mangan-NP mit Mitochondrien, sowie mitochondrieller ROS. Im Rahmen der mechanistischen Arbeiten wurde ein „*Medium Throughput*“-System für das toxikologische Screening von NP entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit konnten toxikologische Mechanismen, ausgelöst durch NP aus verschiedenen Materialien in Lungenepithelzellen, die für die Aktivierung von MAPK relevant sind, aufgeklärt werden.

6. Summary

Engineered nanomaterials represent an important field concerning the application of nanoparticles in the industry. Because of their unique properties, especially the possibility to modify them for specific application targets, they gain more and more importance during the past years. As they can also have toxicological effects, it is necessary to investigate their toxicological potential and a possible human exposure to this nanomaterials.

In the present work the relevance of MAPK-activation in epithelial cells in an *in vitro* system was verified with an immune-histochemistry method *in vivo*. Additionally, a “medium throughput”-method was used to investigate cellular mechanisms which lead to the activation of MAPK-signaling. To identify the formation and relevance of reactive oxygen species, deeper investigations using NPs consisting of a redox-active transition metal were made.

The results showed that *in vivo* the MAPK activation is, comparable to the *in vitro* situation, located in the epithelial cells in alveolar regions of exposed mice. The activation is specific for NP but not for non-NP. The chemical composition of the particles seems to have no influence. A specific activation of ERK1/2 was shown in the *in vitro* studies. The mechanistic investigations showed an influence of particle-induced reactive oxygen species as well as an activation and a translocation of EGFR on the activation of the ERK1/2 signaling cascade. Further studies showed that the generation of reactive oxygen species is not dependent on the redox-activity but on the size and surface of the particles as only NPs seem to induce intracellular reactive oxygen species. First investigations show an interaction of manganese-NP with mitochondria and mitochondrial ROS. During the mechanistic studies a “medium throughput”-system for the toxicological screening of NP was developed.

The toxicological mechanisms, induced by NPs consisting of different materials in lung epithelial cells, which are important for the induction of MAPK-signaling could be clarified.

7. Literatur

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

Acznik I., Lota K., Sierczynska A., Lota, G. (2014). Carbon-Supported Manganese Dioxide as Electrode Material For Asymmetric Electrochemical Capacitors. *Int. J. Electrochem. Sci*, 9: 2518-2534.

Aderem A., Underhill D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology*, 17(1): 593-623.

Akhtar M. J., Ahamed M., Kumar S., Siddiqui H., Patil G., Ashquin M., Ahmad I. (2010). Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells. *Toxicology*, 276(2): 95-102.

Albanese A., Tang P. S., Chan W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14: 1-16.

Albrecht C., Schins R. P., Hohr D., Becker A., Shi T., Knaapen A. M., Borm P. J. (2004). Inflammatory time course after quartz instillation: role of tumor necrosis factor- α and particle surface. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(3): 292-301.

Al-Rawi M., Diabaté S., Weiss C. (2011). Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells. *Archives of toxicology*, 85(7): 813-826.

Amtsblatt der EU 2011/696/EU

Anderson D. S., Patchin E. S., Silva R. M., Uyeminami D. L., Sharmah A., Guo T., Van Winkle L. S. (2015). Influence of Particle Size on Persistence and Clearance of Aerosolized Silver Nanoparticles in the Rat Lung. *Toxicological Sciences*, 144(2): 366-381.

Asuri P., Bale S. S., Pangule R. C., Shah D. A., Kane R. S., Dordick J. S. (2007). Structure, function, and stability of enzymes covalently attached to single-walled carbon nanotubes. *Langmuir*, 23(24): 12318-12321.

Autengruber A., Sydlik U., Kroker M., Hornstein T., Ale-Agha N., Stöckmann D., Unfried K. (2014). Signalling-Dependent Adverse Health Effects of Carbon Nanoparticles Are Prevented by the Compatible Solute Mannosylglycerate (Firoin) In Vitro and In Vivo. *PloS one*, 9(11): e111485.

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22(2):111-80.

Barthel A, Klotz LO (2005) Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress. *Biol Chem* 386: 201-216

Behrens A., Sibilica M., Wagner E. F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nature genetics*, 21(3): 326-329.

BéruBé K., Balharry D., Sexton K., Koshy L., Jones T. (2007). Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(10): 1044-1050.

Bogdan J. (2015). Nanomaterials in medicine-properties of titanium dioxide and perspectives for its application in cancer therapy. *Medycyna Weterynaryjna*, 71(1): 18-23.

Bonini M. G., Rota C., Tomasi A., Mason R. P. (2006). The oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6): 968-975.

Bottini M., Bruckner S., Nika K., Bottini N., Bellucci S. (2006) Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett*, 160: 121-126.

Bowler R. M., Roels H. A., Nakagawa S., Drezgic M., Diamond E., Park R., Doty R. L. (2007). Dose–effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. *Occupational and Environmental Medicine*, 64(3): 167-177.

Braakhuis H.M., Park M., Gosens I., DeJong W.H., Cassee F.r. (2014) Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part and Fibre Toxicol*, 11: 18

Brenner S. A., & Neu-Baker N. M. (2014). Occupational exposure to nanomaterials: Assessing the potential for cutaneous exposure to metal oxide nanoparticles in a semiconductor facility. *Journal of Chemical Health and Safety*.

Brook R., Franklin B., Cascio W., Hong Y., Howard G., Lipsett M., Luepker R., Mittleman M., Samet J., Smith S.J., Taget I., Association. E.P.o.P.a.P.S.o.t.A.H. (2004). Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*, 109: 2655–2671.

Brown MT, Cooper JA (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287 (2-3): 121-149

Brown D. M., Kanase N., Gaiser B., Johnston H., Stone V. (2014). Inflammation and gene expression in the rat lung after instillation of silica nanoparticles: Effect of size, dispersion medium and particle surface charge. *Toxicology letters*, 224(1): 147-156.

Brunner T. J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R. N., Limbach L. K., Stark W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science & technology*, 40(14): 4374-4381.

Büchner N., Ale-Agha N., Jakob S., Sydlik U., Kunze K., Unfried K., Haendeler J. (2013). Unhealthy diet and ultrafine carbon black particles induce senescence and disease associated phenotypic changes. *Experimental gerontology*, 48(1): 8-16.

- Calderwood D. A. (2004). Integrin activation. *Journal of cell science*, 117(5): 657-666.
- Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G. J., Puntès V. (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS nano*, 4(7): 3623-3632.
- Castranova V. (2011). Overview of current toxicological knowledge of engineered nanoparticles. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 53: S14-S17.
- Cedervall T., Lynch I., Foy M., Berggård T., Donnelly S. C., Cagney G., Dawson K. A. (2007). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(30): 5754-5756.
- Chandiran A. K., Yella A., Stefik M., Heiniger L. P., Comte P., Nazeeruddin M. K., Grätzel M. (2013). Low-temperature crystalline titanium dioxide by atomic layer deposition for dye-sensitized solar cells. *ACS applied materials & interfaces*, 5(8): 3487-3493.
- Chang C. C., Chiu J. J., Chen S. L., Huang H. C., Chiu H. F., Lin B. H., Yang C. Y. (2012). Activation of HGF/c-Met signaling by ultrafine carbon particles and its contribution to alveolar type II cell proliferation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(8): L755-L763.
- Chen M., Singer L., Scharf A., von Mikecz, A. (2008). Nuclear polyglutamine-containing protein aggregates as active proteolytic centers. *The Journal of cell biology*, 180(4): 697-704.
- Chen X., Liu L., Peter Y. Y., Mao S. S. (2011). Increasing solar absorption for photocatalysis with black hydrogenated titanium dioxide nanocrystals. *Science*, 331(6018): 746-750.
- Chen Z., Yu A., Ahmed R., Wang H., Li H., Chen Z. (2012). Manganese dioxide nanotube and nitrogen-doped carbon nanotube based composite bifunctional catalyst for rechargeable zinc-air battery. *Electrochimica Acta*, 69: 295-300.
- Chen H., Burnett R., Kwong J., Villeneuve P., Goldberg M., Brook R., van Donkelaar A., Jerrett M., Martin R., Kopp A., Brook J., Copes R. (2014). Spatial association between ambient fine particulate matter and incident hypertension. *Circulation*, 129: 562-569.
- Chithrani B. D., Chan W. C. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters*, 7(6): 1542-1550.
- Cho H. Y., Jedlicka A. E., Reddy S. P., Kensler T. W., Yamamoto M., Zhang L. Y., Kleeberger S. R. (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 26(2): 175-182.
- Christensen F.M., Johnston H.J., Stone V., Aitken R.J., Hankin S., Peters S., Aschberger K. (2010) Nano-silver – feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. *Nanotoxicology*, 4: 284-295.
- Chung T. H., Wu S. H., Yao M., Lu C. W., Lin Y. S., Hun Y., Huang D. M. (2007). The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 28(19): 2959-2966.

- Cobb M.H., Goldsmith E.J. (1995), How Map Kinases Are Regulated, *Journal of Biological Chemistry* 270: 14843-14846
- Cui D. (2005) Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett*, 155: 73-85.
- Dadvand P., Nieuwenhuijsen M. J., Agustí À., de Batlle J., Benet M., Beelen R., Garcia-Aymerich J. (2014). Air pollution and biomarkers of systemic inflammation and tissue repair in COPD patients. *European Respiratory Journal*, 44(3): 603-613.
- Damoiseaux R., George S., Li M., Pokhrel S., Ji Z., France B., Xia T., Suarez E., Rallo R., Mädler L., Cohen Y., Hoek E.M.V., Nel A. (2011) No time to lose – high throughput screening to assess nanomaterial safety. *Nanoscale*, 3: 1345-1360.
- Dannenberg E.M. (1992) Carbon (Carbon black). *Chapter in 'Encyclopedia of Chemical Technology', Vol 4 4th Edition, New York, Wiley Interscience: 1037-1074.*
- Dauderer – Klinische Toxikologie - 58.Erg.-Lfg. 9/9 0
- Dauderer – Handbuch der Umweltgifte Ausgabe 6/2006
- Dawson K. A., Salvati A., Lynch I. (2009). Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nature nanotechnology*, 4(2): 84-85.
- Decuzzi P., Ferrari, M. (2007). The role of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Biomaterials*, 28(18): 2915-2922.
- Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G.L., Levy R.J. (1996) Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res*, 13: 1838-1845.
- Diaz B., Sanchez-Espinel C., Arruebo M., Faro J., de Miguel E., Magadan S., Yague C., Fernandez-Pacheco R., Ibarra M.R., Santamaria J., Gonzalez-Fernandez A (2008) Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticle aggregates. *Small*, 4(11): 2025-2034.
- Dikic I. (2003). Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochemical Society Transactions*, 31(6): 1178-1181.
- Ding L., Stilwell J., Zhang T., Elboudwarej O., Jiang H., Selegue J. P., Chen F. F. (2005). Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Letters*, 5(12): 2448-2464.
- Doherty G. J., McMahon H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78: 857-902.
- Donaldson K., Li X. Y., MacNee W. (1998). Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *Journal of Aerosol Science*, 29(5): 553-560.
- Donaldson K., Tran L., Jimenez L. A., Duffin R., Newby D. E., Mills N., Stone V. (2005). Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology* 2(1): 10.

- Donaldson K., Poland C. A., Murphy F. A., MacFarlane M., Chernova T., Schinwald, A. (2013). Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos—similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews*, 65(15): 2078-2086.
- Duffin R., Tran C. L., Clouter A., Brown D. M., MacNee W., Stone V., Donaldson K. (2002). The importance of surface area and specific reactivity in the acute pulmonary inflammatory response to particles. *Annals of Occupational Hygiene*, 46(suppl 1): 242-245.
- Duffin R., Tran L., Brown D., Stone V., Donaldson K. (2007). Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation toxicology*, 19(10): 849-856.
- Dumortier H., Lacotte S., Pastorin G., Marega G., Wu W. (2006) Functionalized Carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett*, 6: 1522-1528.
- Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J., Oberdörster G (2006) Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect*, 114 (8): 1172-1178.
- Erdely A., Hulderman T., Salmen R., Liston A., Zeidler-Erdely P. C., Schwegler-Berry D., Simeonova P. P. (2008). Cross-talk between lung and systemic circulation during carbon nanotube respiratory exposure. Potential biomarkers. *Nano Letters*, 9(1): 36-43.
- European Environmental Bureau, Statement, 18.10.2011
<http://www.eeb.org/index.cfm/news-events/news/nano-definition-too-narrow-says-eeb/>
- Feng J., Liang Y., Wang H., Li Y., Zhang B., Zhou J., Dai H. (2012). Engineering manganese oxide/nanocarbon hybrid materials for oxygen reduction electrocatalysis. *nano research*, 5(10): 718-725.
- Fickova M (2002) Structure and activation of EGF receptor: minireview. *Endocr.Regul.* 36: 87-93
- Fisher J, Egerton TA (2001) Titanium compounds, inorganic. *Kirk-Othmer encyclopaedia of chemical technology*. Wiley, New York
- Foldvari M., Bagonluri M. (2008a) Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines I. Pharmaceutical properties. *Nanomed*, 4: 173-182.
- Foldvari M., Bagonluri M. (2008b) Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomed*, 4: 183-200.
- Fotakis G., Timbrell J.A. (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, Mtt and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 160: 171-177.
- Frick R., Müller-Edenborn B., Schlicker A., Rothen-Rutishauser B., Raemy D. O., Günther D., Beck-Schimmer B. (2011). Comparison of manganese oxide nanoparticles and manganese sulfate with regard to oxidative stress, uptake and apoptosis in alveolar epithelial cells. *Toxicology letters*, 205(2): 163-172.

- Gasser M., Rothen-Rutishauser B., Krug H. F., Gehr P., Nelle M., Yan B., Wick P. (2010). The adsorption of biomolecules to multi-walled carbon nanotubes is influenced by both pulmonary surfactant lipids and surface chemistry. *Journal of nanobiotechnology*, 8(1): 31.
- Geiser M., Kreyling W. G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*, 7(2): 1-17.
- Genter M. B., Newman N. C., Shertzer H. G., Ali S. F., Bolon B. (2012). Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicologic pathology*, 40(7): 1004-1013.
- Gheshlaghi Z. N., Riazi G. H., Ahmadian S., Ghafari M., Mahinpour R. (2008). Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(9): 777-782.
- Ghosh R.N., Grove L., Lapets O. (2004) A quantitative cell-based high-content screening assay for the epidermal growth factor receptor-specific activation of mitogen-activated protein kinase. *Assay and drug develop technol*, 2(5): 473-481.
- Gilmour P. S., Brown D. M., Lindsay T. G., Beswick P. H., MacNee W., Donaldson K. (1996). Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occupational and Environmental Medicine*, 53(12): 817-822.
- Halonen J. I., Lanki T., Yli-Tuomi T., Kulmala M., Tiittanen P., Pekkanen J. (2008). Urban air pollution and asthma and COPD hospital emergency room visits. *Thorax*.
- Han X., Corson N., Wade-Mercer P., Gelein R., Jiang J., Sahu M., Oberdörster G. (2012). Assessing the relevance of in vitro studies in nanotoxicology by examining correlations between in vitro and in vivo data. *Toxicology*, 297(1): 1-9.
- Hansen C. G., Nichols B. J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends in cell biology*, 20(4): 177-186.
- Harburger D. S., Bouaouina M., Calderwood D. A. (2009). Kindlin-1 and-2 directly bind the C-terminal region of β integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17): 11485-11497.
- Harush-Frenkel O., Debotton N., Benita S., Altschuler Y. (2007). Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 353(1): 26-32.
- Hayer A., Stoeber M., Bissig C, Helenius A. (2010). Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*, 11(3): 361-382.
- Hessen-Nanotech NEWS 4/2006. [Nano-Produktion – Herstellung von und mit Nanotechnologie, Band 9](#), 01.09.2006
- Hillaireau H., Couvreur P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17): 2873-2896.

Hnizdo E., Vallyathan V. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease due to occupational exposure to silica dust: a review of epidemiological and pathological evidence. *Occupational and Environmental Medicine*, 60(4): 237-243.

Hofman E. G., Ruonala M. O., Bader A. N., van den Heuvel D., Voortman J., Roovers R. C., en Henegouwen P. M. V. B. (2008). EGF induces coalescence of different lipid rafts. *Journal of cell science*, 121(15): 2519-2528.

Horter D., Dressmann J.B. (2001) Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev*, 46: 75-87.

Howes M. T., Mayor S., Parton R. G. (2010). Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Current opinion in cell biology*, 22(4): 519-527.

Huang Y. W., Wu C. H., Aronstam R. S. (2010). Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro studies. *Materials*, 3(10): 4842-4859.

Hussain S. M., Javorina A. K., Schrand A. M., Duhart H. M., Ali S. F., Schlager J. J. (2006). The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicological Sciences*, 92(2): 456-463.

Hussain S., Thomassen L. C., Ferecatu I., Borot M. C., Andreau K., Martens J. A., Boland S. (2010). Research Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells.

IARC Monographs Volume 93: Titanium dioxide: 193-276.

Iijima S (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354: 56-58.

Iijima S. (2002). Carbon nanotubes: past, present, and future. *Physica B: Condensed Matter*, 323(1): 1-5.

Iversen T. G., Skotland T., Sandvig K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6(2): 176-185.

Jaurand M. C. (1997). Mechanisms of fiber-induced genotoxicity. *Environmental health perspectives*, 105(Suppl 5): 1073.

Jaurand M. C., Renier A., Daubriac J. (2009). Mesothelioma: Do asbestos and carbon nanotubes pose the same health risk? *Part Fibre Toxicol*, 6(1): 16.

Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Guo X. (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental science & technology*, 39(5): 1378-1383.

Jin C., Tang Y., Yang F. G., Li X. L., Xu S., Fan X. Y., Yang Y. J. (2011). Cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles in anatase and rutile crystal phase. *Biological trace element research*, 141(1-3): 3-15.

- Joris F., Manshian B.B., Peynshaert K., DeSmedt S.C., Braeckmans K., Soenen S.J. (2013) Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. *Chem Soc Rev*, 42(21): 8339-8359.
- Jou M. J. (2008). Pathophysiological and pharmacological implications of mitochondria-targeted reactive oxygen species generation in astrocytes. *Advanced drug delivery reviews*, 60(13): 1512-1526.
- Kamegawa T., Shimizu Y., Yamashita H. (2012). Superhydrophobic Surfaces with Photocatalytic Self-Cleaning Properties by Nanocomposite Coating of TiO₂ and Polytetrafluoroethylene. *Advanced Materials*, 24(27): 3697-3700.
- Karlsson M., Kurz T., Brunk U., Nilsson S., Frennesson, C. (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J*, 428: 183-190.
- Kim Y-M, Reed W, Lenz AG, Jaspers I, Silbajoris R, Nick HS, Samet JM. (2005) Ultrafine carbon particles induce interleukin-8 gene transcription and p38 MAPK activation in normal human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288: 432-441
- Kim J. S., Kim K., Cho W., Shin W. H., Kanno R., Choi J. W. (2012). A truncated manganese spinel cathode for excellent power and lifetime in lithium-ion batteries. *Nano letters*, 12(12): 6358-6365.
- Kim I. Y., Joachim E., Choi H., Kim K. (2015). Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*.
- Kisseleva T., Brenner D. A. (2008). Mechanisms of fibrogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 233(2): 109-122.
- Kittelsohn D.B. (1998) Engines and nanoparticles: a review. *J Aerosol Sc*, 2: 575-588.
- Klotz LO (2002) Oxidant-induced signaling: Effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem* 383, 443-456
- Klotz LO, Sies H (2003) Defense against peroxynitrite: seleno-compounds and flavonoids. *Toxicol Lett* 140-141: 125-132
- Klumpp C., Kostarelos K., Prato M., Bianco A. (2006). Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(3): 404-412.
- Knaapen A.M., Bomr P.J., Albrecht C., Schins R.P. (2004) Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer*, 109: 799-89.
- Korc, M. (1988) Manganese. Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease Prasad, A. S. (ed.), *Current Topics in Nutrition and Disease, Vol. 18*: 253-273. Alan R. Liss Inc., New York

Kostarelos K., Lacerda L., Pastorin G., Wu W., Wieckowski S., Luangsivilay J., Bianco A. (2007). Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature nanotechnology*, 2(2): 108-113.

Kreuter J. (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 47(1): 65-81.

Kyriakis J. M., Avruch J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*, 18(7): 567-577.

Kyung O. Y., Grabinski C. M., Schrand A. M., Murdock R. C., Wang W., Gu B., Hussain S. M. (2009). Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1): 15-24.

Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C. G., Benmerah A., Dautry-Varsat A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular cell*, 7(3): 661-671.

Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Hoet P. (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*, 6(14): 455-460.

Lazar M. A., Varghese S., Nair S. S. (2012). Photocatalytic water treatment by titanium dioxide: recent updates. *Catalysts*, 2(4): 572-601.

Leach R. M., Lilburn S. M.: *World Rev. Nutr. Diet.* 32, 123-134 (1978)

Liao H. Y., Chung Y. T., Lai C. H., Wang S. L., Chiang H. C., Li L. A., Liou S. H. (2014). Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*, 8(sup1): 100-110.

Li N., Wang M., Oberley T. D., Sempf J. M., Nel A. E. (2002). Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *The Journal of Immunology*, 169(8): 4531-4541.

Li N., Hao M., Phalen R. F., Hinds W. C., Nel A. E. (2003). Particulate air pollutants and asthma: a paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical Immunology*, 109(3): 250-265.

Li N., Xia T., Nel A. E. (2008). The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(9): 1689-1699.

Li J.J., Muralikrishnan S., Ng C.T., Yung L.Y., Bay B.H. (2010) Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med*, 235: 1025-1033.

Li S., Malmstadt N. (2013). Deformation and poration of lipid bilayer membranes by cationic nanoparticles. *Soft Matter*, 9(20): 4969-4976.

Liu X., Sun J. (2010). Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF- κ B pathways. *Biomaterials*, 31(32): 8198-8209.

- Liu S., Sui Y., Guo K., Yin Z., Gao X. (2012). Spectroscopic study on the interaction of pristine C60 and serum albumins in solution. *Nanoscale research letters*, 7(1): 1-7.
- Lu X., Qian J., Zhou H., Gan Q., Tang W., Lu J., Liu C. (2011). In vitro cytotoxicity and induction of apoptosis by silica nanoparticles in human HepG2 hepatoma cells. *International journal of nanomedicine*, 6: 1889.
- Lu Y., Low P. S. (2012). Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced drug delivery reviews*, 64: 342-352.
- Lu J., Holmgren A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66: 75-87.
- Lu P. J., Huang S. C., Chen Y. P., Chiueh L. C., Shih D. Y. C. (2015). Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis*.
- Lu Y., Sathasivam S., Song J., Crick C. R., Carmalt C. J., Parkin I. P. (2015). Robust self-cleaning surfaces that function when exposed to either air or oil. *Science*, 347(6226): 1132-1135.
- Luechinger S. (2014). Air pollution and infant mortality: A natural experiment from power plant desulfurization. *Journal of health economics*, 37: 219-231.
- Lundqvist M. (2013). Nanoparticles: tracking protein corona over time. *Nature nanotechnology*, 8(10): 701-702.
- Madl A.K., Plummer L.E., Carosino C., Pinkerton K.E. (2014) Nanoparticles, Lung Injury and the role of oxidant stress. *Annu Rev Physiol*, 76: 447-465.
- Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3): 233-278.
- Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J.W. (2006) Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett*, 6: 1121-1125.
- Manna S. K., Sarkar S., Barr J., Wise K., Barrera E. V., Jejelowo O., Ramesh G. T. (2005). Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor- κ B in human keratinocytes. *Nano letters*, 5(9): 1676-1684.
- Maynard A.D., Kuempel E.D. (2005) Airborne nanostructured particles and occupational health. *J Nanoparticle Res*, 7: 587-614.
- Mayor S., Pagano R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(8): 603-612.
- Mayor S., Parton R. G., Donaldson J. G. (2014). Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(6): a016758.

Medina C., Santos-Martinez M. J., Radomski A., Corrigan O. I., Radomski M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British journal of pharmacology*, 150(5): 552-558.

Milani S., Baldelli-Bombelli F., Pitek A. S., Dawson K. A., Rädler J. (2012). Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona. *ACS nano*, 6(3): 2532-2541.

Monopoli M. P., Åberg C., Salvati A., Dawson K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*, 7(12): 779-786.

Monteiro-Riviere N. A., Nemanich R. J., Inman A. O., Wang Y. Y., Riviere J. E. (2005). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology letters*, 155(3): 377-384.

Morales-Avila, E., Ocampo-García, B. E., de María Ramírez, F., Ferro-Flores, G. (2012). *Radiolabeled nanoparticles for molecular imaging*. INTECH Open Access Publisher.

Moro L., Venturino M., Bozzo C., Silengo L., Altruda F., Beguinot L., Defilippi P. (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *The EMBO journal*, 17(22), 6622-6632.

Mossman B. T., Lounsbury K. M., Reddy, S. P. (2006). Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 34(6): 666-669.

Mossman B. T., Borm P. J., Castranova V., Costa D. L., Donaldson K., Kleeberger S. R. (2007). Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases. *Part Fibre Toxicol*, 4(4): 8974-8977.

Mousavi S., Malerd L., Berg T., Kjekken R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J*, 377: 1-16.

Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Tsutsumi Y. (2011a). Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Particle and fibre toxicology*, 8(1): 1.

Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Tsutsumi Y. (2011b). Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials*, 32(11): 2713-2724.

Nafisi S., Schafer-Korting M., Maibach H.I. (2014) *Perspectives on percutaneous penetration: Silica nanoparticles*. Nanotoxicology: p. 1-15.

Najafpour M. M., Allakhverdiev S. I. (2012). Manganese compounds as water oxidizing catalysts for hydrogen production via water splitting: From manganese complexes to nano-sized manganese oxides. *International journal of hydrogen energy*, 37(10): 8753-8764.

Nan A., Bai X., Son S. J., Lee S. B., Ghandehari H. (2008). Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes. *Nano letters*, 8(8): 2150-2154.

- Naslavsky N., Weigert R., Donaldson J. G. (2004). Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Molecular biology of the cell*, 15(8): 3542-3552.
- Nel A. E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M., Somasundaran P., Thompson M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, 8(7): 543-557.
- Nemery B (1990). Metal toxicity and the respiratory tract. *Eur Respir J* 3, 202-219
- Nemmar A., Hoet P. M., Vanquickenborne B., Dinsdale D., Thomeer M., Hoylaerts M. F., Nemery B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 105(4): 411-414.
- Nielsen S. S., Checkoway H., Criswell S. R., Farin F. M., Stapleton P. L., Sheppard L., Racette B. A. (2015). Inducible nitric oxide synthase gene methylation and parkinsonism in manganese-exposed welders. *Parkinsonism & Related Disorders*.
- Nishikawa T., Iwakiri N., Kaneko Y., Taguchi A., Fukushima K., Mori H., Kadokawa J. I. (2009). Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules*, 10(8): 2074-2085.
- Niska K., Pyszka K., Tukaj C., Wozniak M., Radomski M. W., Inkielewicz-Stepniak I. (2015). Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. *International journal of nanomedicine*, 10: 1095.
- Numano T., Xu J., Futakuchi M., Fukamachi K., Alexander D. B., Furukawa F., Suzui M. (2014). Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(2): 929-935.
- Oberdörster G., Finkelstein J.N., Jihnston C., Gelein R., Cox C., Baggs R., Elder A..C (2000) Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 2000: 5-74. Disc 75-86.
- Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation toxicology*, 16(6-7): 437-445.
- Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K, Yang H. (2005a) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre toxicology*, 2(1): 8.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005b) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113: 823-839.
- Oh P., Borgström P., Witkiewicz H., Li Y., Borgström B. J., Chrastina A., Schnitzer J. E. (2007). Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nature biotechnology*, 25(3): 327-337.

- Park J. H., Troxel A. B., Harvey R. G., Penning T. M. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chemical research in toxicology*, 19(5): 719-728.
- Park Y. H., Bae H. C., Jang Y., Jeong S. H., Lee H. N., Ryu W. I., Son S. W. (2013). Effect of the size and surface charge of silica nanoparticles on cutaneous toxicity. *Molecular & Cellular Toxicology*, 9(1): 67-74.
- Parsons SJ, Parsons JT (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23(48): 7906-7909
- Parton R. G., Simons K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(3): 185-194.
- Parton R. G., del Pozo M. A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(2): 98-112.
- Passagne I., Morille M., Rousset M., Pujalté I., L'Azou B. (2012). Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology*, 299(2): 112-124.
- Pasqua L., Cundari S., Ceresa C., Cavaletti G. (2009). Recent development, applications, and perspectives of mesoporous silica particles in medicine and biotechnology. *Current medicinal chemistry*, 16(23): 3054-3063.
- Penning T. M., Burczynski M. E., Hung C. F., McCoull K. D., Palackal N. T., Tsuruda L. S. (1999). Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chemical research in toxicology*, 12(1): 1-18.
- Peuschel H., Sydlik U., Haendeler J., Büchner N., Stöckmann D., Kroker M., Unfried K. (2010). c-Src-mediated activation of Erk1/2 is a reaction of epithelial cells to carbon nanoparticle treatment and may be a target for a molecular preventive strategy. *Biological chemistry*, 391(11): 1327-1332.
- Peuschel H., Sydlik U., Grether-Beck S., Felsner I., Stöckmann D., Jakob S., Unfried K. (2012). Carbon nanoparticles induce ceramide- and lipid raft-dependent signalling in lung epithelial cells: a target for a preventive strategy against environmentally-induced lung inflammation. *Particle and fibre toxicology*, 9(48).
- de Planque M. R., Aghdaei S., Roose T., Morgan H. (2011). Electrophysiological characterization of membrane disruption by nanoparticles. *ACS nano*, 5(5): 3599-3606.
- Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R. (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 1619-1633.

Pol A., Martin S., Fernández M. A., Ingelmo-Torres M., Ferguson C., Enrich C., Parton R. G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Molecular biology of the cell*, 16(4): 2091-2105.

Poland C. A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A., Seaton A., Donaldson K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology*, 3(7): 423-428.

Pope C. A., Turner M. C., Burnett R. T., Jerrett M., Gapstur S. M., Diver W. R., Brook R. D. (2015). Relationships between Fine Particulate Air Pollution, Cardiometabolic Disorders, and Cardiovascular Mortality. *Circulation research*, 116(1): 108-115.

Prakash S., Malhotra M., Shao W., Tomaro-Duchesneau C., Abbasi S. (2011). Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 63(14): 1340-1351.

Punnonen E. L., Ryhänen K., Marjomi V. S. (1998). At reduced temperature, endocytic membrane traffic is blocked in multivesicular carrier endosomes in rat cardiac myocytes. *European journal of cell biology*, 75(4): 344-352.

Racoosin E. L., Swanson J. A. (1992). M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *Journal of cell science*, 102(4): 867-880.

Rancan F., Gao Q., Graf C., Troppens S., Hadam S., Hackbarth S., Vogt A. (2012). Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS nano*, 6(8): 6829-6842.

Ravid T., Heidinger J. M., Gee P., Khan E. M., Goldkorn T. (2004). c-Cbl-mediated ubiquitylation is required for epidermal growth factor receptor exit from the early endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35): 37153-37162.

Ren J., Shen S., Wang D., Xi Z., Gu, L., Pang Z., Jiang X. (2012). The targeted delivery of anticancer drugs to brain glioma by PEGylated oxidized multi-walled carbon nanotubes modified with angiopep-2. *Biomaterials*, 33(11): 3324-3333.

Rijnboutt S., Jansen G., Posthuma G., Hynes J. B., Schornagel J. H., Strous G. J. (1996). Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. *The Journal of cell biology*, 132(1): 35-47.

Robertson J. M., Smith R. G. (1994). Carbon black. *Patty's industrial hygiene and toxicology*, 2(Part D): 2395-423.

Roney C., Kulkarni P., Arora V., Antich P., Bonte F., Wu A., Aminabhavi T. M. (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 108(2): 193-214.

- Rota C., Chignell C. F., Mason, R. P. (1999). Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(7): 873-881.
- Roth T. F., Porter K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. L. *The Journal of cell biology*, 20(2): 313-332.
- Rothen-Rutishauser B. M., Schürch S., Haenni B., Kapp N., Gehr P. (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environmental science & technology*, 40(14): 4353-4359.
- Sabharanjak S., Sharma P., Parton R. G., Mayor S. (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Developmental cell*, 2(4): 411-423.
- Sahay G., Alakhova D. Y., Kabanov A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release*, 145(3): 182-195.
- Saptarshi S.R., Duschl A., Lopata A.L (2013) Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J of Nanobiotech*, 11: 26.
- Sayes C.M., Reed K.L., Warheit D.B. (2007) Assessing toxicity of fine and Nanoparticles: Comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles.
- Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. (2007) Comparative pulmonary toxicity assessment of C₆₀ water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vitro* profiles. *Nano Lett* 7: 2399-2406.
- Schins RPF (2002) Mechanisms of genotoxicity of particles and fibres. *Inhal Toxicol* 14: 57-78
- Schinwald A., Murphy F., Prina-Mello A., Poland C., Byrne F., Glass J., Donaldson K. (2012). The threshold length for fibre-induced acute pleural inflammation: shedding light on the early events in asbestos-induced mesothelioma. *Toxicological Science*: kfs171.
- Schwartz J., Marcus A. (1990). Mortality and air pollution J London: a time series analysis. *American journal of epidemiology*, 131(1): 185-194.
- Schwarze P. E., Øvrevik J., Låg M., Refsnes M., Nafstad P., Hetland R. B., Dybing E. (2006). Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Human & experimental toxicology*, 25(10): 559-579.
- SCCS/1539/14; Revision of 25 June 2015
- Seaton A., Godden D., MacNee W., Donaldson K. (1995). Particulate air pollution and acute health effects. *The Lancet*, 345(8943): 176-178.
- Shaposhnikov D., Revich B., Bellander T., Bedada G. B., Bottai M., Kharkova T., Pershagen G. (2014). Mortality related to air pollution with the Moscow heat wave and wildfire of 2010. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 25(3): 359.

- Sharma V., Singh P., Pandey A. K., Dhawan A. (2012). Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1): 84-91.
- Shaulian E., Karin M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20(19): 2390-2400.
- Shaulian E., Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology*, 4(5): E131-E136.
- Shvedova A. A., Kisin E. R., Mercer R., Murray A. R., Johnson V. J., Potapovich A. I., Baron P. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(5): L698-L708.
- Shvedova A.A., Pietroiusti A., Fadeel B., Kagan V.E. (2012) Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, 261: 121-133.
- Singh R. P., Ramarao P. (2012). Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicology letters*, 213(2): 249-259.
- Sohaebuddin S. K., Thevenot P. T., Baker D., Eaton J. W., Tang L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and fibre toxicology*, 7(1): 22.
- Squadrito G. L., Cueto R., Dellinger B., Pryor W. A. (2001). Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(9): 1132-1138.
- Stoeger T., Reinhard C., Takenaka S., Schroepel A., Karg E., Ritter B., Schulz H. (2006). Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environmental health perspectives*: 328-333.
- Swanson J. A., Watts C. (1995). Macropinocytosis. *Trends in cell biology*, 5(11): 424-428.
- Sydlik U., Bierhals K., Soufi M., Abel J., Schins R. P., Unfried K. (2006). Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(4): L725-L733.
- Sydlik U., Gallitz I., Albrecht C., Abel J., Krutmann J., Unfried K. (2009). The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180(1): 29-35.
- Sydlik U., Peuschel H., Paunel-Görgülü A., Keymel S., Krämer U., Weissenberg A., Unfried K. (2013). Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation. *European Respiratory Journal*, 41(2): 433-442.

- Tabei Y., Sonoda A., Nakajima Y., Biju V., Makita Y., Yoshida Y., Horie M. (2015). In vitro evaluation of the cellular effect of indium tin oxide nanoparticles using the human lung adenocarcinoma A549 cells. *Metallomics*.
- Tamaoki J., Isono K., Takeyama K., Tagaya E., Nakata J., Nagai A. (2004). Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: 1127-1133
- Tedesco S., Doyle H., Blasco J., Redmond G., Sheehan D. (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 100(2): 178-186.
- Tian F., Cui D., Schwarz H., Estrada G.G., Kobayashi H. (2006) Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol in vitro*, 20: 1202-1212.
- To T., Zhu J., Villeneuve P. J., Simatovic J., Feldman L., Gao C., Miller A. B. (2015). Chronic disease prevalence in women and air pollution — A 30-year longitudinal cohort study. *Environment international*, 80: 26-32.
- Tomas A., Futter C. E., Eden E. R. (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends in cell biology*, 24(1): 26-34.
- Umezawa M., Kudo S., Yanagita S., Shinkai Y., Niki R., Oyabu T., Sugamata M. (2011). Maternal exposure to carbon black nanoparticle increases collagen type VIII expression in the kidney of offspring. *The Journal of toxicological sciences*, 36(4): 461-468.
- Underhill D. M., Ozinsky A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology*, 20(1): 825-852.
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L. O., Von Mikecz A., Grether-Beck S., Schins R. P. (2007). Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1): 52-71.
- Unfried K., Sydlik U., Bierhals K., Weissenberg A., Abel J. (2008). Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(2): L358-L367.
- Urner M., Schlicker A., Z'graggen B. R., Stepuk A., Booy C., Buehler K. P., Beck-Schimmer B. (2014). Inflammatory response of lung macrophages and epithelial cells after exposure to redox active nanoparticles: Effect of solubility and antioxidant treatment. *Environmental science & technology*, 48(23): 13960-13968.
- Vance M. E., & Marr L. C. (2015). Exposure to airborne engineered nanoparticles in the indoor environment. *Atmospheric Environment*, 106: 503-509.
- Venkatasubbu G. D., Ramasamy S., Ramakrishnan V., Kumar J. (2013). Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Advanced Powder Technology*, 24(6): 947-954.

- Wang C., Youle R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics*, 43: 95-118.
- Wang W., Xie Y., Wang Y., Du H., Xia C., Tian F. (2014). Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized on unhybridized titanium dioxide nanotube arrays. *Microchimica Acta*, 181(3-4): 381-387.
- Wangoo N., Suri C. R., Shekhawat G. (2008). Interaction of gold nanoparticles with protein: a spectroscopic study to monitor protein conformational changes. *Applied Physics Letters*, 92(13): 133104.
- Weissenberg A., Sydlik U., Peuschel H., Schroeder P., Schneider M., Schins R. P., Unfried K. (2010). Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4): 597-605.
- Xia T., Kovoichich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Nel A. E. (2006). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*, 2(10): 2121-2134.
- Ye Y., Liu J., Xu J., Sun L., Chen M., Lan M. (2010). Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. *Toxicology in Vitro*, 24(3): 751-758.
- Yehia H. N., Draper R. K., Mikoryak C., Walker E. K., Bajaj P., Musselman I. H., Pantano P. (2007). Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J. Nanobiotechnol*, 5(8): 1-8.
- Yousef A., Barakat N. A., El-Newehy M. H., Ahmed M. M., Kim H. Y. (2015). Catalytic hydrolysis of ammonia borane for hydrogen generation using Cu (0) nanoparticles supported on TiO₂ nanofibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 470: 194-201.
- van der Zande M., Vandebriel R. J., Van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serrano-Rojero C. S., Bouwmeester H. (2012). Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS nano*, 6(8): 7427-7442.
- Zayed S. M., Alshimy A. M., Fahmy A. E. (2014). Effect of Surface Treated Silicon Dioxide Nanoparticles on Some Mechanical Properties of Maxillofacial Silicone Elastomer. *International journal of biomaterials*.
- Zhang R., Dai Y., Zhang X., Niu Y., Meng T., Li Y., Zheng Y. (2014). Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers. *Particle and fibre toxicology*, 11(1): 1-14.
- Zhao Y., Sun X., Zhang G., Trewyn B. G., Slowing I. I., Lin V. S. Y. (2011). Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS nano*, 5(2): 1366-1375.
- Zhou Y.M., Zhong C.Y., Kennedy I.M., Leppert V.J., Pinkerton K.E. (2003) Oxidative stress and NFκB activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 190: 157-169.

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Klaus Unfried für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und für die Stellung des Themas. Weiterhin möchte ich ihm für 3 Jahre Hilfestellung, Ratschläge, Gespräche und auch für zahlreiche Verbesserungsvorschläge danken, auch wenn ich sie erst im Nachhinein zu würdigen weiß.

Ebenso danke ich meinem Zweit-Gutachter Prof. Lutz Schmitt, dass er die Zweit-Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und sich während der 3 Jahre Zeit genommen hat, um mit seiner Arbeitsgruppe meine Zwischenergebnisse zu diskutieren. Ebenso danke ich auch der Jürgen Manchot Stiftung für die Unterstützung in Form eines Stipendiums.

Darüber hinaus möchte ich mich noch bei mehreren Personen vom IUF bedanken, die mir während der 3 Jahre ebenso tatkräftig zur Seite gestanden haben, sei es durch Gespräche, Probleme anhören oder Tipps und Tricks bei Versuchen und Geräten. Besonders hervorheben möchte ich dabei die AG Haendeler, mit Jojo, Yogi und Nilo, die immer ein offenes Ohr hatten. Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Prof. Ellen Fritsche, für die Möglichkeit, das Cellomics sowie ihre Labore zu nutzen. Explizit bedanken möchte ich mich in dem Zusammenhang bei Martin Schmuck, der mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat bei der Erlernung im Umgang des Geräts.

Natürlich danke ich ebenfalls meinen Arbeitskollegen. Ragnhild Wirth für die fachmännische Unterstützung im Labor und Herrn Brock für seine Hilfe bei Bestellungen, Lösungen und verschollenen Chemikalien. Auch Ulli danke ich für die Unterstützung und Orientierungshilfe, vor allem zu Beginn der Arbeit. Auch bei meinen Mitstreitern und Kollegen, Daniel, Alex, Tamara und Matthes möchte ich mich bedanken, mit denen man Sorgen und Ängste teilen konnte, aber auch Mittagspausen verbringen konnte, um einfach mal abzuschalten. Dabei möchte ich natürlich Tim nicht vergessen, der zwar erst seit Kurzem bei uns ist, aber dennoch für eine lustige Zeit im Büro gesorgt hat. Ohne euch hätte ich die Zeit hier wahrscheinlich nicht so angenehm überstanden.

Zuletzt, aber keineswegs weniger herzlich, danke ich natürlich meiner Familie und meinen Freunden. Danke, denn ohne euch wäre ich nichts. Danke Mama, Papa, Bruderherz und auch meiner besten Freundin Kathi für tatkräftiges Unterstützen, gut zureden und Mut machen. Ich danke euch allen unendlich, dass ihr in dieser schwierigen Zeit für mich da wart. Nicht vergessen möchte ich natürlich meine Kuschelocker! Euch danke ich für zahlreiche Ablenkungen, spaßige Tage und ganz viele offene Ohren!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christiane Bieschke
Geburtsdatum/-ort	18. Februar 1987 in Düsseldorf
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Ausbildung

4/2012 - 09/2015	<p>Promotion in Chemie (magna cum laude) Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung Schwerpunkt: Toxikologie von Nanopartikeln</p> <p>□</p> <p>Titel der Promotion: <i>„Molekulare Mechanismen der Nanopartikel-Zell-Interaktion als toxikologischer Parameter für moderne Nanomaterialien“</i></p>
10/2009 - 12/2011	<p>Master-Studium der Toxikologie (Note 1,7) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf</p> <p>Titel der Masterarbeit: <i>„Der Einfluss von Größe und Gestalt von Nanopartikeln auf die Induktion von zellulären Signalprozessen“ (Note 1,2)</i></p>
10/2006 - 09/2009	<p>Bachelor-Studium der Chemie (Note 2,8) Bergische Universität Wuppertal</p> <p>Titel der Bachelorarbeit: <i>„Untersuchung der Inhaltsstoffe von Cannabis sativa im Vergleich mit Humulus lupulus“ (Note 2,0)</i></p>
6/2006	<p>Abitur (Note 2,1) Gymnasium am Neandertal, Erkrath</p>

Berufserfahrung

04/2012 bis 08/2015 **wissenschaftlicher Mitarbeiter**
 Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung,
 Düsseldorf

Nebenjobs

11/2011 bis 12/2011 Aushilfe Rechenzentrum der Finanzverwaltung

04/2009 bis 10/2011 Servicekraft bei Mise en Place Germany, Standort
 Düsseldorf
 Ab 10/2009 JobCoach
 Ab 07/2010 Projektleiter

09/2006 Kinderbetreuung bei der AWO

08/2005 bis 09/2006 Aushilfe bei NewLab BioQuality

Sonst. Kenntnisse

Sprachen	Englisch	fließend in Wort und Schrift
	Französisch	Grundkenntnisse
	Spanisch	Grundkenntnisse
EDV	MS Office (Word, Excel, Power Point)	
	SPSS	
Zertifikate	„Introduction to Good Scientific Practice“	
	„English for business (Level 2)“	
	Tierexperimenteller Kurs; FELASA B	

Eidesstattliche Erklärung

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

(Christiane Bieschke)

Düsseldorf, 03. August 2015